

Ю.А.Владимиров, А.Я.Потапенко

# ФИЗИКО- ХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ фотобиологических процессов

Допущено  
Государственным комитетом СССР  
по народному образованию  
в качестве учебного пособия  
для студентов медицинских  
и биологических специальностей  
высших учебных заведений



МОСКВА «ВЫСШАЯ ШКОЛА» 1989

ББК 24.5  
В 57  
УДК 541.14

Рецензенты:

кафедра физико-химической биологии МГУ (зав. кафедрой проф.  
Ф. Ф. Литвин) и проф. Е. Е. Фесенко (Институт биофизики АН СССР)

**Владимиров Ю. А., Потапенко А. Я.**

**В57** Физико-химические основы фотобиологических процессов:  
Учеб. пособие для мед. и биол. спец. вузов.— М.: Высш. шк.,  
1989.— 199 с.: ил.

ISBN 5—06—000494—5

В пособии рассмотрены теоретические, методические и прикладные вопросы фотобиологии и фотомедицины.

Пособие состоит из двух частей. В первой части излагаются основные закономерности фотофизических процессов в биомолекулах, во второй—основные вопросы первичных стадий фотохимических превращений биологически активных молекул. Рассмотрены механизм и роль фотореакций белков, нуклеиновых кислот и липидов в индукции фотобиологических и фотомедицинских процессов.

В 1910000000 (4309000000)—104  
001 (01)—89 136—89

**ББК 24.5**  
**541**

ISBN 5—06—000494—5

© Издательство «Высшая школа», 1989

## ПРЕДИСЛОВИЕ

Учебное пособие представляет собой раздел общего курса биофизики, преподаваемого студентам медико-биологических факультетов медицинских институтов.

Изучение фотобиологических процессов — одна из составных частей современной биофизики. К области фотобиологии относят раздел биологической науки, изучающий закономерности и механизмы действия света на биологические системы различной сложности организации. В биофизике изучаются преимущественно первичные стадии взаимодействия квантов света с биологическими структурами: макромолекулами, мембранами, клетками и тканями. Для понимания механизма этих стадий приходится привлекать арсенал современных физических наук: молекулярной спектроскопии, теории люминесценции и фотохимии с применением современной аппаратуры и техники эксперимента. Знание первичных стадий фотобиологических процессов абсолютно необходимо не только для понимания фотобиологических явлений, таких, как зрение, фотосинтез, повреждающее и лечебное действие ультрафиолетового (УФ) и лазерного излучения и т. д., но также и для практического применения достижений фотобиологии в таких разделах медицины, как фототерапия, фотохимиотерапия, хирургия и терапия с использованием лазерного излучения, лабораторная диагностика, основанная на применении спектрального и люминесцентного анализов, и т. д.

Изучение первичных физико-химических стадий фотобиологических процессов неразрывно связано с широким использованием спектральных методов исследования биологических структур. Следовательно, преподавание физико-химических основ фотобиологических процессов должно идти совместно с овладением студентами теории и экспериментальной техники спектрофотометрии и спектрофлуориметрии, измерения хемилюминесценции и других оптических методов исследования. По этой причине одновременно с теоретическим курсом физико-химических основ фотобиологии студенты медико-биологических факультетов медицинских институтов проходят практикум по спектральным методам исследования, который входит важной составной частью в экспериментальную подготовку будущих врачей-биофизиков.

Специфика преподавания фотобиологии в медицинских вузах связана с тем, что основное внимание уделяется фотобиологическим процессам, протекающим в тканях человека и животных (зрение, действие УФ- или лазерных лучей на кожу и т. д.), тогда

как фотосинтез, фототропизм и фототаксис лежат вдалеке от проблем клинической медицины. Это не могло не найти отражения и в данной книге.

Рассмотрение вопросов взаимодействия света и биологических систем — первый этап изучения биофизики в медицинском вузе, поэтому предполагается, что вопросы молекулярной биофизики и биофизики клетки читателям известны только в самых общих чертах. С другой стороны, книга рассчитана на читателей, уже изучивших основные разделы биологии, химии, физики и математики в объеме программы медико-биологических факультетов.

Авторы поставили перед собой цель: систематически изложить только основополагающие сведения, которые понадобятся при знакомстве практически с любой новой публикацией в области физико-химической фотобиологии. Общеизвестно исключительно широкое распространение спектральных методов исследования в современной биологии и медицине, а также все большее использование видимого света и ультрафиолетовых лучей в терапии, хирургии и биотехнологии. Это позволяет надеяться, что данное пособие окажется полезным не только для студентов медицинских вузов, но и для студентов биологических факультетов университетов, аспирантов, врачей и научных работников, которые имеют дело с фотобиологическими явлениями и использованием спектральных методов исследования в своей работе. Книга написана как учебник для первого ознакомления с предметом, и ее прочтение может рассматриваться как необходимый этап перед более углубленным изучением предмета по монографиям и статьям.

*Авторы*

## ВВЕДЕНИЕ

Действие света на живые организмы весьма разнообразно. Фотосинтез, фототропизм, фотопериодизм и фототаксис, зрительное восприятие, покраснение кожи при УФ-облучении, образование витамина D, бактерицидное и мутагенное действие УФ-облучения, фотодинамические эффекты — все эти процессы вызываются действием света и изучаются в разных разделах фотобиологии. Изучение начальных стадий фотобиологических процессов, которые заканчиваются образованием первых устойчивых химических соединений, можно считать областью биофизики. Дальнейшие процессы происходят по биохимическим и физиологическим законам.

Важно, что явления, протекающие на первых, биофизических стадиях: поглощение света; перераспределение энергии в молекуле, находящейся в электронном возбужденном состоянии; межмолекулярный перенос энергии; образование первичных фотопродуктов (обычно свободнорадикальной природы) и превращение их в первые химически устойчивые соединения, — оказываются общими для всех фотобиологических процессов. Именно это и дает возможность объединить рассмотрение первичных стадий фотобиологических процессов в одной книге с единой точки зрения. По этой же причине сходны в общих чертах и основные методы исследования разных фотобиологических процессов, коль скоро речь идет об их начальных, биофизических стадиях. Спектрофотометрия и люминесцентный анализ; импульсное облучение объектов в сочетании с быстродействующими методами регистрации оптических изменений в этих объектах; использование низких температур для изучения нестабильных промежуточных продуктов; применение вакуумной техники; регистрация свечения, сопровождающего рекомбинацию первичных, свободнорадикальных продуктов; использование метода электронного парамагнитного резонанса для идентификации этих продуктов — весь этот арсенал средств в равной мере применяется при исследовании первичных стадий как процессов фотосинтеза, так и действия ультрафиолета на белки и нуклеиновые кислоты, а также начальных этапов зрительного процесса.

Таким образом, если фотобиология в целом может рассматриваться как сложный мультидисциплинарный комплекс, то учение о биофизических стадиях фотобиологических процессов является стройной и единой в своей основе научной дисциплиной.

Взаимодействие света и живой материи начинается с акта поглощения фотонов и перехода молекул в возбужденное состояние. Этот процесс регистрируется спектрофотометрически, и поэтому основы биологической спектрофотометрии входят в первый раздел настоящего курса. Размен энергии возбуждения включает высвечивание квантов люминесценции. Изучение люминесценции представляет теоретический интерес и является важным этапом фотобиологического исследования. Во многих случаях может происходить перенос энергии электронного возбуждения на соседние молекулы; интерес к этому явлению, одно время несколько ослабевший, вновь вспыхнул в связи с использованием метода переноса энергии для оценки расстояния между молекулами в биологических системах.

При изучении собственно фотохимических процессов исследователь прежде всего сталкивается с необходимостью изучения кинетики и спектров действия фотобиологического явления, затем на повестку дня встает изучение первичных, чаще всего свободно-радикальных стадий фотохимических реакций. Это изучение стало возможным благодаря развитию техники низких температур и быстродействующих методов спектрофотометрии, а также метода электронного парамагнитного резонанса. Заканчивается фотохимическая реакция образованием устойчивых продуктов, что приводит к конечному эффекту—фотобиологическому действию света. Особое место занимает явление хемилюминесценции. Это явление интенсивно изучается и широко используется в аналитических целях. Оно представляет собой не стадию фотобиологического процесса, а как бы фотобиологический процесс «наоборот», поскольку химические реакции не вызываются поглощением, а сопровождаются испусканием кванта света.

Фотобиологические эффекты в разных случаях различны и могут рассматриваться лишь для каждого из них по отдельности: фотохимия белков и нуклеиновых кислот, зрение, действие света на кожу и т. д. В соответствии с таким развитием фотобиологических процессов и построена данная книга.

## РАЗДЕЛ I

# ФОТОФИЗИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ В МОЛЕКУЛАХ. СВОЙСТВА ЭЛЕКТРОННО-ВОЗБУЖДЕННЫХ СОСТОЯНИЙ МОЛЕКУЛ

### ГЛАВА I

## ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ФОТОНОВ С БИОЛОГИЧЕСКИ ВАЖНЫМИ СОЕДИНЕНИЯМИ

### 1.1. Характеристики светового излучения.

#### Электронные переходы в молекулах

Световое излучение, как известно, характеризуется длиной волны  $\lambda$  (нм, мкм, м) электромагнитных колебаний, частотой  $\nu$  ( $\text{с}^{-1}$ ) и энергией квантов света (фотонов)  $E$  (Дж), причем

$$E = h\nu = hc/\lambda, \quad (1.1)$$

где  $h$  — постоянная Планка ( $6,626 \cdot 10^{-34}$  Дж·с);  $c$  — скорость света.

В работах по спектроскопии часто используют так называемое волновое число  $\bar{\nu} = 1/\lambda$  ( $\text{см}^{-1}$ ), которое пропорционально частоте электромагнитных колебаний и, следовательно, энергии фотонов. В фотохимических экспериментах, когда количество вещества выражают в молях, а концентрацию — в молях на литр, удобно использовать количество энергии, соответствующее не одному фотону, а  $N_A$  фотонов, где  $N_A$  — постоянная Авогадро ( $6,023 \cdot 10^{23}$  моль $^{-1}$ ). Эта величина названа *эйнштейном* (Дж/моль). Таким образом, 1 эйнштейн — это энергия 1 моль фотонов, которая равна

$$E = N h \nu = N h c / \lambda. \quad (1.2)$$

Из выражения (1.2) следует, что величина одного эйнштейна меняется и зависит от длины волны света. Например, для излучения  $\lambda = 300$  нм 1 эйнштейн составляет 399 кДж/моль, а для 400 нм — 299 кДж/моль. Если энергию излучения выражать в эйнштейнах, то численно эта величина равна числу молей фотонов.

*Поток излучения*\*  $\Phi$  (Вт или эйнштейн/с) равен энергии, переносимой через некоторую поверхность  $S$  за единицу времени:

$$\Phi = dE/dt.$$

---

\* В русской литературе также используют термины лучистый поток, мощность излучения, в англ. — radiant flux, radiant power; во франц. — flux energetique; в нем. — Strahlungsfluss.

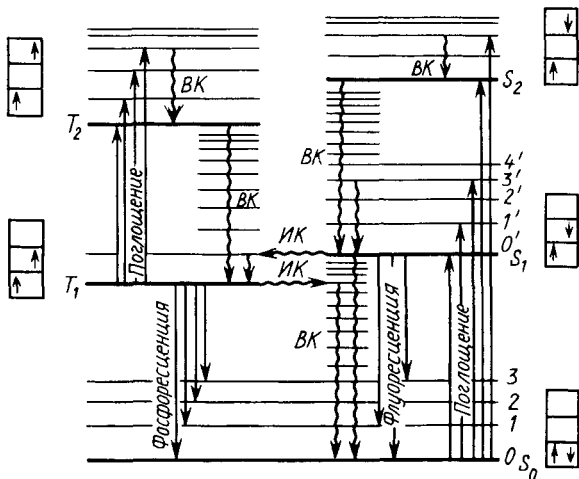


Рис. 1.1. Электронные переходы в биомолекулах:  $S_0$  — основное (невозбужденное) состояние.  $S_1$ ,  $S_2$  и  $T_1$ ,  $T_2$  — возбужденные соответственно синглетные и триплетные состояния; около каждого уровня показано направление спина возбужденного электрона по отношению к спину оставшегося электрона; жирные горизонтальные линии — чисто электронные уровни энергии, тонкие (0, 1, 2 ... или 0', 1', 2' ...) — колебательные уровни; прямые стрелки — поглощательные и излучательные переходы, волнистые — безызлучательные переходы; ВК — внутренняя конверсия (переходы электрона без обращения спина); ИК — интеркомбинационная конверсия (переходы электрона с обращением спина)

**Интенсивность света** \* [(Вт/м<sup>2</sup>, или эйнштейн/(м<sup>2</sup>·с)] выражают в виде плотности потока излучения, т. е. потока, падающего на единицу площади, перпендикулярной к направлению распространения света:

$$I = \Phi / S.$$

**Доза излучения** \*\* Д (Дж/м<sup>2</sup>, эйнштейн/м<sup>2</sup>) (энергетическая экспозиция, количество облучения, экспозиционная доза) равна произведению интенсивности на длительность облучения:

$$D = It.$$

При взаимодействии света с веществом может происходить преломление световых лучей и их рассеяние, либо поглощение фотонов молекулами, или то и другое вместе. Если произошло

\* Англ.— fluence rate; франц.—debit de dose; нем.—Dosisleistung.

\*\* Англ.— fluence, dose, radiant exposure; франц.— exposition énergétique, dose; нем.— Bestrahlung, Dosis.



поглощение кванта света молекулой, то через  $10^{-9}$ — $10$  с может происходить испускание части поглощенной энергии в виде кванта света с большей длиной волны; такое излучение называют *люминесценцией*. Различают два вида люминесценции— флуоресценцию и фосфоресценцию, отличающихся по времени жизни и энергии излучаемых фотонов. Изучение поглощения фотонов и люминесценции позволяет судить о строении поглощающих свет молекул или участков молекулы (хромофоров), а также производить их качественный и количественный анализ, выяснять физико-химические свойства среды, окружающей молекулы или их хромофорные группы.

На основании измерения спектров поглощения и люминесценции можно построить схему энергетических уровней данной молекулы (рис. 1.1).

Дело в том, что каждая молекула имеет серию заполненных и свободных электронных орбиталей. Поглощение кванта света приводит к переходу электрона на орбиталь с большей энергией (молекула при этом переходит на более высокий энергетический уровень). Обратный переход может сопровождаться испусканием кванта люминесценции. Энергия поглощенного или испускаемого кванта равна разности энергии между уровнями:

$$E_2 - E_1 = h\nu.$$

Наряду с электронными переходами в молекуле, сопровождающимися испусканием фотона (флуоресценцией и фосфоресценцией), после поглощения кванта возможен ряд безызлучательных переходов с более высоких электронных уровней и колебательных подуровней на нижележащие уровни и подуровни. Если между молекулами в системе имеется взаимодействие, то возможен безызлучательный перенос (или миграция) энергии от одной молекулы к другой. Все эти процессы перераспределения энергии электронного возбуждения, разыгрывающиеся начиная с поглощения кванта, называют *фотофизическими процессами*.

## 1.2. Поглощение монохроматического света растворами

Пусть на кювету с раствором исследуемого вещества падает пучок монохроматического света с интенсивностью  $I_0$  (рис. 1.2). Если в образце происходит поглощение света, то в результате интенсивность света ослабится до величины  $I$ . Отношение этих величин называют *пропусканием*  $T$ :

$$T = I/I_0. \quad (1.3)$$

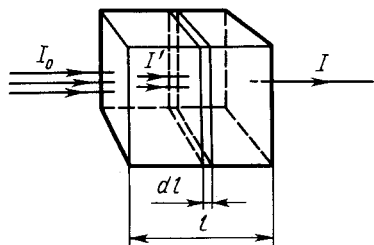


Рис. 1.2. Схема к выводу закона Бугера—Ламберта—Бера

света, т. е. величины  $(1 - T)$ , и уменьшению пропускания образца  $T$ . Однако эти величины непропорциональны концентрации раствора и толщине кюветы.

Найдем зависимость  $T$  от концентрации и толщины раствора. Для этого выделим в объеме образца тонкое сечение  $dl$  (рис. 1.2), перпендикулярное направлению  $I_0$  ( $\text{Вт/см}^2$ ). Пусть концентрация поглощающих свет молекул равна  $n$  ( $\text{см}^{-3}$ ). Согласно теории мишени каждая молекула характеризуется эффективным сечением  $s$  ( $\text{см}^2$ ), называемым *поперечным сечением поглощения*, при попадании в которое происходит поглощение фотона. Суммарная площадь мишеней, приходящаяся на  $1 \text{ см}^2$  раствора толщиной  $dl$ , будет равна  $sndl$ . Ослабление интенсивности света слоем  $dl$  равно

$$dI'/I' = -sndl, \quad (1.4)$$

а после интегрирования (1.4)

$$\int_{I_0}^I \frac{dI'}{I'} = -sn \int_0^l dl,$$

получим  $\ln(I/I_0) = -snl$ ,  
или

$$I/I_0 = T = e^{-snl}. \quad (1.5)$$

Уравнение (1.5) является математическим выражением *закона Бугера—Ламберта—Бера* — основного закона ослабления света веществом, из которого следует, что  $T$  и  $(1 - T)$  зависят от  $n$  и  $l$  экспоненциально. Такая зависимость не удобна для количественных определений концентрации. Перейдя к более распространенным размерностям концентрации  $c$  (моль/л) и к десятичному логарифму, получим выражение для оптической плотности \*  $D$

$$-\lg(I/I_0) = -\lg T = \epsilon cl = D, \quad (1.6)$$

\* В английской литературе чаще используют обозначение  $A$  от слова absorbance — поглощаемость.

где  $\varepsilon$  — молярный коэффициент поглощения [л/(моль·см)], связанный с  $s$  соотношением

$$\varepsilon = \frac{N_A \lg e}{1000} s = 2,62 \cdot 10^{20} s.$$

В спектрофотометрии непосредственной величиной, измеряемой прибором, оказывается отношение интенсивности света  $I$ , прошедшего через кювету с раствором, к интенсивности света  $I_0$ , прошедшего через такую же кювету с растворителем. Обычно в приборе предусмотрено устройство, которое преобразует полученную величину пропускания в оптическую плотность в соответствии с уравнением (1.6). Это преобразование имеет смысл потому, что в отличие от непосредственно измеряемого пропускания  $T$  и коэффициента поглощения  $(1 - T)$  оптическая плотность  $D$  есть величина аддитивная: оптическая плотность смеси двух растворов равна сумме оптических плотностей каждого из них:

$$D_{1+2} = D_1 + D_2. \quad (1.7)$$

Чтобы убедиться в справедливости уравнения (1.7), найдем величины пропускания  $T_{1+2}$  и оптической плотности  $D_{1+2}$  двух последовательно расположенных образцов (например, двух светофильтров или двух кювет с растворами, пропускание и оптическая плотность которых равны соответственно  $T_1$ ,  $T_2$ ,  $D_1$  и  $D_2$ ). Пусть интенсивность света, падающего на первый образец,  $I_0$ , на второй —  $I_1$ , а света, выходящего из второго образца, —  $I_2$ . Тогда пропускание последовательно расположенных первого, второго образцов и системы из двух образцов равно по (1.3)

$$T_1 = I_1/I_0; \quad T_2 = I_2/I_1 \quad \text{и} \quad T_{1+2} = I_2/I_0. \quad (1.8)$$

Из уравнений (1.8) следует, что  $T_{1+2} = T_1 T_2$ .

На основании (1.6) оптические плотности рассматриваемых образцов равны:

$$D_1 = -\lg T_1; \quad D_2 = -\lg T_2 \quad \text{и} \quad D_{1+2} = -\lg T_{1+2}. \quad (1.9)$$

Сложив  $D_1$  и  $D_2$  и используя уравнения (1.8) и (1.9), получаем

$$D_1 + D_2 = -\lg(T_1 T_2) = D_{1+2}. \quad (1.10)$$

Аналогичным путем легко показать, что оптическая плотность последовательно расположенных элементов равна сумме оптических плотностей каждого из них:

$$\Sigma D_i = D_{\Sigma}. \quad (1.11)$$

Поскольку гомогенный раствор смеси нескольких веществ можно представить как чередование бесконечно тонких слоев растворов каждого из этих веществ в отдельности, уравнения (1.10) и (1.11) применимы не только к последовательно располо-

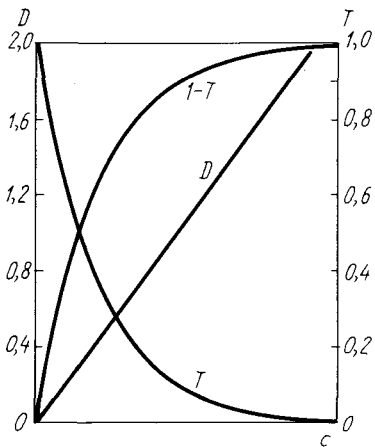


Рис. 1.3. Зависимость пропускания ( $T$ ), коэффициента поглощения ( $1 - T$ ) и оптической плотности ( $D$ ) от концентрации ( $c$ ) хромофора в растворе

концентрация и оптических плотностях. Это обусловлено тем, что передние слои ослабляют свет, доходящий до задних слоев раствора. В тонких слоях раствора или в растворах низкой концентрации этим явлением можно пренебречь и зависимость поглощения от концентрации вещества (или толщины кюветы) имеет линейный характер. Количественно связь ( $1 - T$ ) и  $D$  может быть представлена в виде

$$1 - T = 1 - 10^{-D}.$$

Приближенное значение ( $1 - T$ ) при малых величинах находят как первый член степенного ряда:

$$1 - T \approx \ln 10 D \approx 0,4343 D. \quad (1.12)$$

Формула (1.12) тем точнее, чем меньше оптическая плотность раствора. При величинах коэффициента поглощения 0,1 и 0,2 (оптических плотностях соответственно 0,045 и 0,097) ошибка в расчете  $D$  по уравнению (1.12) составляет 4,5 и 10%. При более высоких значениях коэффициента поглощения света и оптических плотностях линейность между  $D$  и ( $1 - T$ ) заметно нарушается (см. рис. 1.3).

Закон Бугера — Ламберта — Бера выполняется не всегда. Наблюдаемые от закона отклонения могут, с одной стороны, служить помехой при количественном анализе, с другой — давать дополнительную информацию о свойствах исследуемых объектов. Перечислим возможные причины появления таких отклонений.

женным светофильтром, но и к растворам смеси веществ: оптическая плотность смеси равна сумме оптических плотностей всех отдельно взятых компонентов.

Прямым следствием аддитивности оптических плотностей является уравнение (1.6), согласно которому  $D$  пропорциональна концентрации раствора  $c$  и длине кюветы  $l$ .

На рис. 1.3 приведена зависимость оптической плотности, пропускания  $T$  и коэффициента поглощения раствора ( $1 - T$ ) от концентрации раствора. Видно, что с увеличением концентрации раствора (или длины оптического пути света  $l$ ) оптическая плотность растет линейно, тогда как зависимость поглощения ( $1 - T$ ) приближается к линейной только в начале графика, т. е. при малых

1. Закон выводился в предположении, что молекулы хромофоров распределены в растворе равномерно. Если хромофор распределен неравномерно (например, гемоглобин в суспензии нативных эритроцитов по сравнению с гемолизатом), то это будет приводить к занижению оптической плотности вследствие *эффекта сита* (см. разд. 1.8). Занижение тем выше, чем больше оптическая плотность частиц.

2. В формулировке закона (1.6) подразумевается, что  $\epsilon$  является константой, не зависящей от концентрации. Если при повышении концентрации характер взаимодействия между хромофорами меняется (например, происходит агрегация молекул), то фотофизические свойства молекул, в том числе и значение  $\epsilon$ , будут изменяться.

3. Зависимость  $D$  от  $c$  может отклоняться от линейной при использовании немонахроматического света.

4. В растворе под действием измеряющего света не должны сколько-нибудь заметно протекать фотохимические превращения хромофоров.

5. Интенсивность измеряющего светового пучка должна быть достаточно низка, чтобы в результате поглощения света концентрация невозбужденных молекул практически не уменьшалась в ходе измерения.

6. Если помимо поглощения образец рассеивает свет, то произойдет завышение  $D$ .

7. Точному измерению оптической плотности может мешать люминесценция образца. Если фотоны люминесценции будут попадать на фотодетектор, то это приведет к занижению  $D$ .

### 1.3. Спектры пропускания и спектры поглощения

*Спектром пропускания* называют зависимость пропускания образца  $T$  от длины волны  $\lambda$ . Спектр пропускания обычно используют для характеристики светофильтров, но не веществ, так как форма этих кривых зависит как от концентрации вещества, так и от толщины кюветы.

Зависимость оптической плотности  $D$  какого-либо объекта, например раствора, от длины волны  $\lambda$  измеряющего света называют *спектром поглощения* данного объекта. Спектр раствора индивидуального соединения принято нормировать к единице концентрации и длины кюветы; т. е. спектром поглощения индивидуального вещества называют зависимость от длины волны измеряющего света молярного коэффициента поглощения  $\epsilon$  (1.6).

Спектры поглощения биологически важных веществ (рис. 1.4) представляют собой сравнительно плавные кривые с одним или несколькими максимумами. У атомов и простых молекул в газовой фазе спектры поглощения линейчатые.

В чем причина превращения узких линий атомов и молекул в газовой фазе в широкие (размытые) спектры поглощения, характерные для растворов биомолекул? Ведь энергии не только электронных уровней, но и колебательных и вращательных подуровней в молекулах квантованы, и энергии электронных переходов (а значит, и длины волн поглощаемых квантов) должны быть дискретными!

Дело в том, что в растворителе и биологических системах каждая молекула хромофора окружена несколькими полярными молекулами

среды, дипольные моменты которых создают локальные электрические поля. Энергия электронных переходов при наличии внешнего электрического поля несколько изменяется, а следовательно, происходит изменение длины волны света, поглощаемого при данном электронном переходе. Эти сдвиги в энергии электронного перехода для каждой молекулы зависят от ориентации молекул среды и расстояния до них в момент поглощения кванта. Величины энергии сдвигов не квантуются, они могут принимать в определенных пределах любые значения. Суперпозиция огромного числа смещенных линий поглощения, каждая из которых как бы соответствует индивидуальным молекулам, приводит к появлению плавной кривой поглощения раствора в целом. Максимум на этой кривой ( $\epsilon_{\max}$ ) соответствует наиболее вероятной, усредненной величине энергии электронного перехода, которая может быть вычислена по (1.1), где  $\lambda$ —положение максимума.

Каждая полоса поглощения в абсорбционном спектре, помимо положения максимума, может быть охарактеризована еще тремя величинами: площадью под кривой поглощения, амплитудой  $\epsilon_{\max}$  и полушириной полосы  $\Delta\lambda_{1/2}$  (или  $\Delta\bar{\nu}_{1/2}$ ), которая равна расстоянию между точками на кривой поглощения, соответствующему половине амплитуды, т. е.  $\epsilon_{\max}/2$  (рис. 1.5).

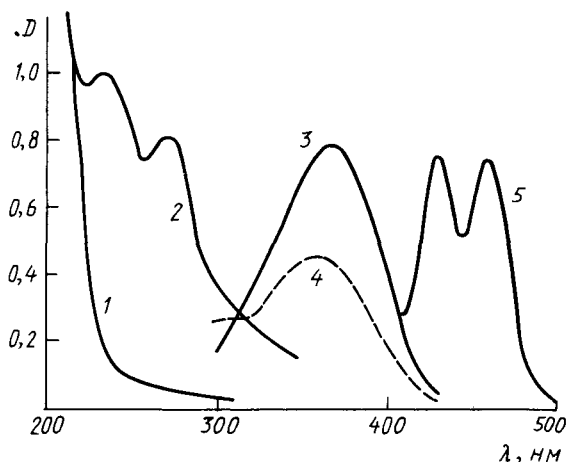


Рис. 1.4. Зависимость положения длинноволнового максимума поглощения от числа сопряженных двойных связей ( $N$ ) в молекуле:

1—фосфолипиды, выделенные из мозга ( $N=1$ ); 2—окисленные фосфолипиды: диеновые конъюгаты  $\lambda_{\max}=233$  нм ( $N=2$ ), триеновые конъюгаты  $\lambda_{\max}=270-280$  нм ( $N=3$ ) и частично карбонильные соединения; 3—полностью-транс-ретиналь ( $N=6$ ); 4—11-цис-ретиналь ( $N=6$ ); 5—каротиноиды ( $N=11$ )

Площадь под кривой поглощения на графике зависимости  $\epsilon$  от волнового числа  $\bar{\nu}$  (рис. 1.5) прямо пропорциональна безразмерной величине, называемой *силой осциллятора*  $f$ , которая характеризует вероятность электронных переходов в результате захвата квантов света данным хромофором:

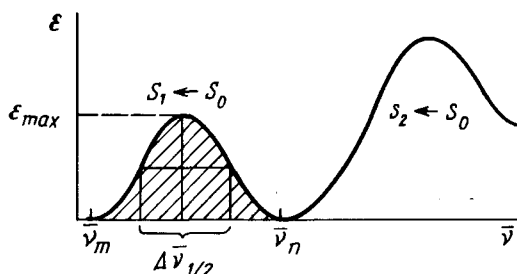


Рис. 1.5. Полосы поглощения, соответствующие различным электронным переходам

$$f_{mn} = 4,32 \cdot 10^{-9} \int_{\bar{\nu}_m}^{\bar{\nu}_n} \epsilon(\bar{\nu}) d\bar{\nu}. \quad (1.13)$$

Электрон, поглощая фотоны той или иной энергии, может переходить на разные возбужденные электронные уровни ( $S_1$ ,  $S_2$  и т. д.) (см. рис. 1.1), при этом в спектре поглощения вещества будет наблюдаться несколько полос (рис. 1.5). Если сложить площади полос поглощения, обусловленных переходами электронов с одной и той же электронной орбитали (одноэлектронный переход), то выполняется правило сумм Куна—Томаса:  $f=1$ . Другими словами, если все полосы поглощения обусловлены одноэлектронным переходом, то сила осциллятора по всем этим полосам будет равна 1, при двухэлектронном переходе  $f=2$  и т. д. Для многих сильно окрашенных соединений характерно то, что длинноволновая полоса поглощения обусловлена одним сильным электронным переходом с силой осциллятора, близкой к единице. По этой причине площадь длинноволновой полосы поглощения таких веществ приблизительно одинакова, несмотря на то, что химическая структура веществ может заметно различаться.

Рассмотрим вопрос о соотношении  $\epsilon_{\max}$  и  $\Delta\bar{\nu}_{1/2}$ . Форма кривой в каждой полосе спектра поглощения  $\epsilon(\bar{\nu})$  близка к кривой нормального распределения. Для подобных кривых существует определенное соотношение между площадью под кривой, амплитудой и полушириной, выражаемое уравнением

$$\int_{\bar{\nu}_m}^{\bar{\nu}_n} \epsilon(\bar{\nu}) d\bar{\nu} \approx \epsilon_{\max} \Delta\bar{\nu}_{1/2}. \quad (1.14)$$

Для большинства красителей  $\Delta\bar{\nu}_{1/2} \approx 5000 \text{ см}^{-1}$ . Приняв силу осциллятора в данной полосе поглощения за максимальную величину, равную 1, из (1.13) и (1.14) находим, что  $\epsilon_{\max} = 5 \cdot 10^4 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$  и приближается к значению  $\epsilon$  в максимуме наиболее окрашенных соединений.

## 1.4. Спектры поглощения и химическая структура биологически важных соединений

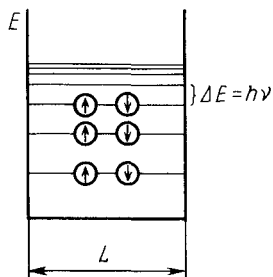
Из спектров поглощения некоторых биологически важных соединений (см. рис. 1.4) видно, что чем больше в молекуле число сопряженных двойных связей, тем больше длина волны максимума поглощения данного вещества. Молекулы пероксидов жирных кислот содержат две сопряженные двойные связи (диеновые конъюгаты), максимум в спектре поглощения лежит при 233 нм. Продукты пероксидного окисления липидов, содержащие три сопряженные двойные связи (триеновые конъюгаты), имеют максимум поглощения 260—280 нм. Ретиналь, молекулы которого содержат 6 сопряженных двойных связей, характеризуется максимумом поглощения 360 нм.

Квантовая механика позволяет объяснить связь между структурой вещества и положением длинноволнового максимума поглощения. Дело в том, что в сопряженной системе связей  $\pi$ -электроны делокализованы, т. е. могут двигаться по цепочке сопряженных связей свободно, подобно электронам проводимости в металле. Предположим, сопряженная цепь состоит из  $N$  звеньев, включающих по одной двойной и одной одинарной связи, тогда общая длина цепи равна  $L = Nl$ , где  $l$  — длина одного звена. Можно считать, что  $\pi$ -электроны внутри системы сопряженных связей находятся в прямоугольной потенциальной яме с высокими стенками (рис. 1.6), их средняя скорость перемещения равна  $v$ . Согласно соотношению де Бройля в квантовой механике движущемуся электрону соответствует волна, длина которой равна

$$\lambda = h/mv, \quad (1.15)$$

где  $h$  — постоянная Планка;  $m$  — масса электрона.

Электрон (волна) не выходит за пределы потенциальной ямы; минимум энергии в такой системе (т. е. ее устойчивое состояние) соответствует ситуации, когда внутри ямы возникают стоячие волны с узлами на стенках. В потенциальной яме длиной  $L$  должно укладываться целое число  $n$  полуволен



$$L = n\lambda/2, \quad (1.16)$$

где  $n = 1, 2, 3, \dots$  и т. д. Подставив  $\lambda$  из (1.16) в уравнение (1.15), находим возможные значения скорости электрона

$$v = h/m\lambda = nh/2mL,$$

Рис. 1.6. Энергетические уровни  $\pi$ -электронов в потенциальной яме

его кинетическая энергия равна

$$E = mv^2/2 = n^2 h^2 / 8mL^2.$$



Таким образом, энергия  $\pi$ -электронов в молекуле квантована и может иметь значения  $h^2/8mL^2$ ,  $4h^2/8mL^2$ ,  $9h^2/8mL^2$ , ..., но не промежуточные. Согласно принципу Паули на каждом уровне энергии могут располагаться только два электрона с противоположными спинами. Следовательно,  $2N$   $\pi$ -электронов  $N$ -членной цепи занимают  $N$  уровней с энергиями от  $h^2/8mL^2$  до  $N^2h^2/8mL^2$ .

Вычислим теперь частоту  $\nu$  наиболее длинноволновой полосы поглощения молекулы, которая соответствует переходу электрона с верхней заполненной молекулярной орбитали на нижнюю свободную:

$$h\nu = (E_{N+1} - E_N),$$

откуда

$$\nu = \frac{1}{h} \left\{ \frac{(N+1)^2 h^2}{8mL^2} - \frac{N^2 h^2}{8mL^2} \right\}. \quad (1.17)$$

Подставив в (1.17)  $L = Nl$ , находим

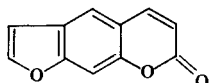
$$\nu = \frac{2N+1}{N^2} \frac{h}{8ml^2}. \quad (1.18)$$

При  $N \geq 2$  первый сомножитель в (1.18) можно принять  $\approx 2/N$ , тогда  $\nu \approx \frac{h}{4ml^2} \frac{1}{N}$ , т. е. длина волны поглощаемого света пропорциональна  $N$ :

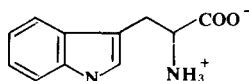
$$\lambda = \frac{c}{\nu} \approx \frac{4mcl^2}{h} N. \quad (1.19)$$

Вследствие большого числа допущений, сделанных при выводе уравнения (1.19), его нельзя применять с целью количественного расчета положения максимума поглощения того или иного органического соединения с известным числом сопряженных двойных связей. Но качественно оно иллюстрирует известный экспериментальный факт — с увеличением числа сопряженных связей в молекуле максимум в спектре поглощения сдвигается в сторону больших длин волн (см. рис. 1.4).

Молекулы большинства веществ, поглощающих свет в видимой и ближней ультрафиолетовой областях спектра, имеют наряду с сопряженными двойными связями гетероатомы, например атомы кислорода в молекуле псоралена или азота в индолном кольце триптофана, входящие в систему сопряженных связей или непосредственно примыкающие к ней:



псорален



триптофан



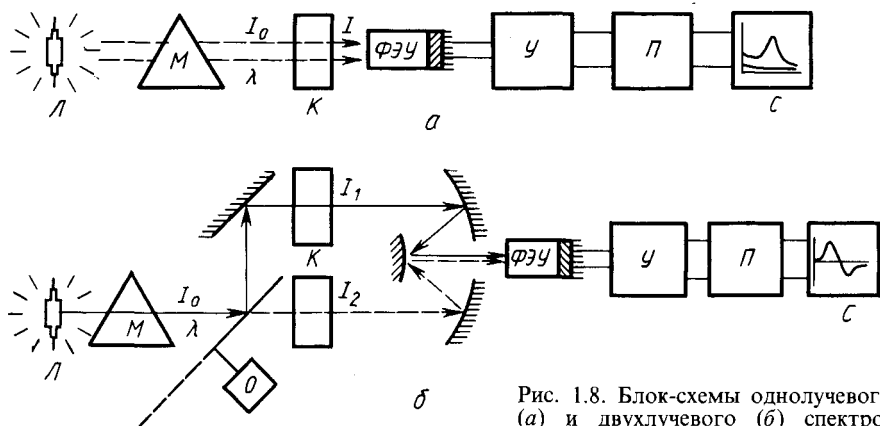


Рис. 1.8. Блок-схемы однолучевого (а) и двухлучевого (б) спектрофотометров

кания  $T = I/I_0$ , либо оптической плотности по уравнению (1.6). Эти величины при различных длинах волн записывают самописцем.

Однолучевые спектрофотометры уступают двухлучевым по своим характеристикам, на результатах измерения спектров сказывается нестабильность светового излучения ламп, чувствительности ФЭУ и электронной системы усиления фототока.

В двухлучевых спектрофотометрах (рис. 1.8, б) монохроматический пучок света расщепляется на два с помощью вращающегося зеркала с секторными вырезами (обтюратор  $O$ ). Эти два одинаковых по интенсивности пучка проходят через две кюветы с растворами, один из которых служит в качестве контрольного. Фотоумножитель измеряет сигналы, попеременно поступающие к нему на выходе из кювет. После усиления эти сигналы преобразуются в отношение световых потоков  $I_1/I_2 = \Delta T$  и затем в  $\Delta D = -\lg(\Delta T)$ . Кривая  $\Delta D = f(\lambda)$  записывается самописцем. Таким образом, двухлучевой спектрофотометр специально предназначен для записи разностных спектров (см. разд. 1.7). На нем можно записывать и обычные спектры поглощения, если в качестве образца сравнения взять кювету с растворителем. Поскольку обтюратор дает  $\sim 50$  сигналов для каждого пучка в 1 с, а современные микропроцессоры в состоянии произвести расчеты с каждой парой таких сигналов (учитывая также темновой ток ФЭУ), все медленные изменения чувствительности ФЭУ и интенсивности излучения лампы автоматически исключаются, так как отношение  $I_1/I_2$  остается постоянным при одновременном и однонаправленном изменении сигналов  $I_1$  и  $I_2$ . В итоге дифференциальные спектрофотометры в отличие от однолучевых более чувствительны и позволяют измерять разницу в оптической плотности образцов до  $10^{-4}$  при базовой оптической плотности до 2.

При измерении спектров поглощения на спектрофотометре может показаться, что монохроматор позволяет получить абсо-

лютно монохроматическое излучение. Однако это не так. Ширина щелей на входе и выходе монохроматора не бесконечно мала, в результате чего выделяется не строго монохроматический пучок, а интервал длин волн  $\Delta\lambda_{\text{щ}}$ , называемый спектральной шириной щелей. Выбор спектральной ширины щелей зависит от разрешенности спектра поглощения. Считается, что соотношение между  $\Delta\lambda_{\text{щ}}$  и полушириной полос поглощения  $\Delta\lambda_{1/2}$  должно удовлетворять уравнению

$$\Delta\lambda_{\text{щ}} \leq \Delta\lambda_{1/2} / 10.$$

Другая причина возможных ошибок при измерении спектров поглощения — присутствие в монохроматическом измеряющем пучке примеси блуждающего света — фотонов с другими длинами волн, попадающими на выход монохроматора вследствие многократных отражений вошедшего в прибор света на внутренних деталях прибора. Блуждающий свет может занижать или, наоборот, завышать  $D$ . Эффект блуждающего света можно резко снизить, если на пути измеряющего светового пучка дополнительно установить светофильтр, пропускающий излучение в исследуемой области спектра и не пропускающий блуждающий свет. При работе в коротковолновом ультрафиолете рекомендуется использовать двойные монохроматоры (свет, вышедший из первого монохроматора, подается на вход второго).

### **1.6. Качественный и количественный спектрофотометрический анализ**

Качественный спектрофотометрический анализ основывается на том, что каждое соединение имеет характерный для него спектр поглощения. Для идентификации вещества наиболее важны следующие параметры: 1) число максимумов в спектре поглощения; 2) положение (длина волны) каждого максимума; 3) значения коэффициентов поглощения в каждом из максимумов (в единицах  $s$  или  $\epsilon$ ); 4) отношение амплитуд максимумов (т. е. отношение коэффициентов поглощения в максимумах), если их несколько.

Сложность спектра поглощения зависит от того, какому числу электронных переходов между разными уровнями соответствует данный спектр. Считается, что каждый электронный переход дает полосу поглощения, которая на графике представлена кривой, близкой к гауссовой кривой нормального распределения.

Количественный спектрофотометрический анализ основан на применении закона Бугера — Ламберта — Бера (1.5) и (1.6). При количественном анализе можно одновременно определять концентрацию нескольких веществ, если спектры их поглощения различаются по форме. Суммарный спектр поглощения смеси нескольких веществ есть простая сумма спектров поглощения компонентов, так как при всех длинах волн оптические плотности компонентов суммируются. Например, для двухкомпонентной

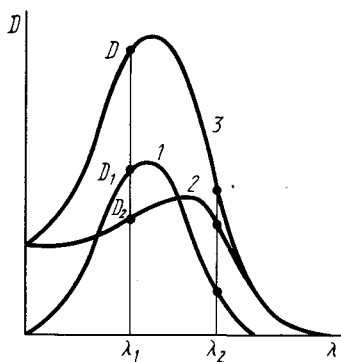


Рис. 1.9. Количественный спектрофотометрический анализ смеси двух веществ: 1, 2 — спектры компонентов; 3 — спектр смеси

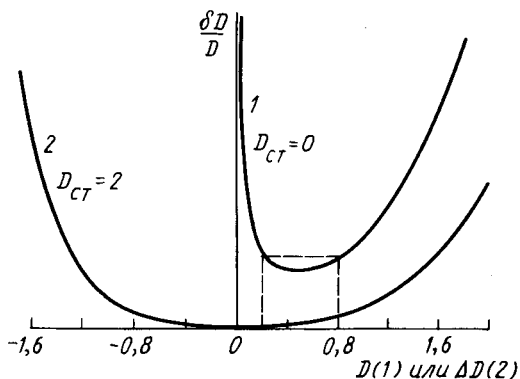


Рис. 1.10. Ошибка определения оптической плотности  $\delta D/D$  при обычной (1) и разностной (2) спектрофотометрии

смеси при любой длине волны  $D = D_1 + D_2$ , где  $D_1$  и  $D_2$  — оптические плотности компонентов. Исходя из уравнения (1.10) можно записать

$$D = \varepsilon_1 c_1 l + \varepsilon_2 c_2 l.$$

Если молярные коэффициенты поглощения для обоих веществ  $\varepsilon_1$  и  $\varepsilon_2$  известны, равно как и толщина кюветы  $l$ , то найти неизвестные концентрации  $c_1$  и  $c_2$  нельзя, если измерения  $D$  проводились при одной длине волны. Для двух разных длин волн получают систему из двух уравнений с двумя неизвестными, решив которую, находят обе концентрации:

$$D(\lambda_1) = \varepsilon_1(\lambda_1) c_1 l + \varepsilon_2(\lambda_1) c_2 l,$$

$$D(\lambda_2) = \varepsilon_1(\lambda_2) c_1 l + \varepsilon_2(\lambda_2) c_2 l.$$

Выбранные две длины волны  $\lambda_1$  и  $\lambda_2$  должны быть такими, для которых молярные коэффициенты поглощения компонентов различаются больше всего; это не всегда соответствует максимумам в спектре поглощения веществ (рис. 1.9). Теоретически, если число длин волн, используемых для измерений, равно числу компонентов, можно проанализировать и более сложные смеси. На практике же редко удается осуществить количественный спектрофотометрический анализ более 2—3 соединений в одной смеси. Критерием правильности анализа может служить совпадение реконструированного спектра, рассчитанного после определения концентраций, по уравнению

$$D = \sum_i \varepsilon_i c_i l$$

со спектром смеси, измеренным в опыте.

При количественном спектрофотометрическом анализе главная задача исследователя — измерить концентрации, а значит, и оптические плотности растворов с большей возможной точностью. Можно показать, что наименьшая погрешность в определении концентрации получается при оптической плотности раствора от 0,2 до 0,8. Для этого примем постоянной абсолютную ошибку при измерении интенсивности света  $\delta I$  приемником и найдем минимум функции  $\delta D/D = f(D)$ , где  $\delta D$  — абсолютная, а  $\delta D/D$  — относительная ошибка при измерении оптической плотности. Согласно уравнению (1.6)

$$D = \lg I_0 - \lg I. \quad (1.20)$$

Продифференцировав уравнение (1.20), перейдем к конечным приращениям аргумента  $\delta I$  и функции  $\delta D$ :

$$\delta D = 0,4343 \delta I / I. \quad (1.21)$$

Подставив в уравнение (1.21)  $I$  из (1.6), получим

$$\delta D = 0,4343 \delta I / I_0 10^{-D}, \quad (1.22)$$

откуда

$$\delta D / D = 0,4343 \delta I / I_0 D 10^{-D}. \quad (1.23)$$

Зависимость  $\delta D/D$  от  $D$  приведена на рис. 1.10, кривая 1. В растворах относительная ошибка в определении оптической плотности растет как при  $D < 0,2$ , так и при  $D > 0,8$ . Минимум на кривой можно найти, продифференцировав уравнение (1.23) (он лежит при  $D = 0,4343$ ) и приравняв нулю первую производную. Ошибка мало увеличивается в интервале значений  $D = 0,2—0,8$  ( $T = 15—65\%$ ).

Есть несколько способов, позволяющих добиться максимальной точности спектрофотометрического анализа: а) разбавление раствора; б) уменьшение толщины образца; в) подбор длины волны фотометрирования, при которой обеспечивается попадание измеряемых величин оптической плотности в оптимальные пределы.

## 1.7. Разностная спектрофотометрия

При изучении биологических систем часто необходимо измерить небольшие изменения оптической плотности на фоне сильного поглощения и светорассеяния образца. Это можно сделать двумя способами.

1. Последовательно измеряют спектры поглощения опытного образца  $D_2 = -\lg(I_2/I_0)$  и образца сравнения  $D_1 = -\lg(I_1/I_0)$ , затем вычитают из первой величины вторую и получают разностный спектр поглощения, т. е. кривую зависимости  $D_2 - D_1$  от длины волны.

2. Непосредственно измеряют разностный спектр поглощения без регистрации интенсивности света, прошедшего через пустую кювету ( $I_0$ ), сравнивают интенсивности света, прошедшего через опытный  $I_2$  и контрольный  $I_1$  образцы:

$$\Delta D = -\lg(I_2/I_1).$$

Метод разностной спектрофотометрии дает возможность определить величину  $\Delta D$  с большей точностью, чем при последовательном измерении спектров двух сравниваемых образцов. Выигрыш в точности измерения тем выше, чем больше общая оптическая плотность, т. е. чем меньше отношение  $\Delta D/D_2$ .

Мерой точности измерения в разностной спектрофотометрии, как и в обычной, служит относительная инструментальная ошибка при определении оптической плотности  $\delta D/D$ , где  $\delta D$  — абсолютная ошибка определения,  $D$  — оптическая плотность образца. Значение абсолютной ошибки оптической плотности находят, как и при обычной спектрофотометрии, по уравнению (1.22) с той разницей, что вместо  $I_0$  следует использовать интенсивность света, прошедшего через образец сравнения  $I_1$ . Если  $\delta I$  не зависит от  $I$ , то абсолютная ошибка при определении оптической плотности  $\delta D$  одинакова при обычной и разностной спектрофотометрии, но относительная ошибка  $\delta D/D$  при разностной спектрофотометрии значительно ниже, так как в знаменатель входит величина  $D_1 + \Delta D$ , где  $\Delta D$  — измеряемая в разностном спектре оптическая плотность;  $D_1$  — фоновая оптическая плотность образца сравнения.

На рис. 1.10 (кривая 2) приведен график зависимости  $\delta D/D$  от  $\Delta D$ , из которого видно, что метод разностной спектрофотометрии дает наибольшие преимущества при высокой оптической плотности образца (кривая дана для  $D_1 = 2$ ) и малых величинах изменения оптической плотности в опытном образце по сравнению с контрольным.

## 1.8. Искажения спектров в биологических объектах

При измерениях спектров поглощения биологических объектов, таких, как целая ткань или суспензия клеток, могут возникнуть искажения, причиной которых могут быть: а) эффект многократного отражения и рассеяния света на частицах и б) эффект сита (или проскока).

В результате светорассеяния происходит отклонение измеряющего светового пучка от первоначального направления, вследствие чего не весь прошедший свет попадает на фотоприемник. Это приводит к завышению измеряемой оптической плотности. Для борьбы с эффектом светорассеяния используют спектрофотометры, снабженные светоизмерительным шаром (интегрирующей сферой Ульбрихта). В этом случае практически весь рассеянный

образцом свет попадает на фотоприемник, и измеряемая оптическая плотность обусловлена только истинным поглощением. В некоторых приборах для борьбы с эффектом светорассеяния сразу за кюветами располагают светорассеивающие пластинки, а фотодетектор максимально приближают к кюветам. Фактически рассеивающая пластинка нивелирует разницу между мутными и прозрачными образцами. Дело в том, что большая часть света, рассеянного частицами в суспензии, направлена вперед и попадает на пластинку. Фотодетектор измеряет свет, рассеянный пластинкой, а не образцом. Таким образом, интенсивность регистрируемого света мало зависит от того, рассеивает образец свет или нет.

Однако далеко не все приборы приспособлены для автоматического учета влияния светорассеяния, в таких случаях вводят поправки. Рассмотрим один из таких методов.

Можно считать поглощение и рассеяние света независимыми процессами, т. е. измеряемая оптическая плотность  $D$  есть сумма оптической плотности, обусловленной светорассеянием  $D_p$ , и оптической плотности, обусловленной истинным поглощением  $D_n$ ,

$$D = D_p + D_n. \quad (1.24)$$

Чтобы найти  $D_n = f(\lambda)$  по уравнению (1.24), нужно знать зависимость  $D_p$  от длины волны. Известно, что для суспензии частиц в отсутствие поглощения

$$D_p = \beta / \lambda^n, \quad (1.25)$$

где  $\beta$  и  $n$  — константы, причем в зависимости от формы и размеров частиц  $n$  может иметь значения от 0 до 4.

Прологарифмировав уравнение (1.25), получим

$$\lg D_p = \lg \beta - n \lg \lambda,$$

где  $\lg D_p$  — линейная функция  $\lg \lambda$ .

Построив график зависимости  $\lg D = f(\lg \lambda)$ , можно убедиться, что в длинноволновой области спектра, где поглощение отсутствует ( $D_n = 0$ ), получится прямая линия; экстраполировав ее, можно найти величину  $\lg D_p$ , а следовательно,  $D_p$  во всем измеренном спектральном интервале. В заключение рассчитываем  $D_n = D - D_p$  и строим истинный спектр поглощения  $D_n = f(\lambda)$ .

Поглощение света суспензией окрашенных частиц (например, эритроцитов) отличается от поглощения света раствором окрашенного вещества (например, раствором гемоглобина, вышедшего из эритроцитов при гемолизе). Это различие в поглощении объясняют *эффектом сита*, суть которого поясняется на рис. 1.11,  $A$  и  $B$ .

При прохождении пучка света интенсивностью  $I_0$  через объект, в котором окрашенное вещество распределено неравномерно,



ослабление пучка будет различным в тех местах, где свет проходит через окрашенные частички  $I_a$  и  $I_0$ , и там, где он их минует. Если суммарная площадь сечения частиц равна  $S_a$ , а площадь всего образца  $S$ , то величина падающего светового потока будет равна  $I_0 S$ , а прошедшего через образец  $I_a S_a + I_0 (S - S_a)$ . Пропускание такого образца равно

$$T = \frac{I_a S_a + I_0 (S - S_a)}{I_0 S} = \frac{S_a}{S} (T_a - 1) + 1. \quad (1.26)$$

Эту величину полезно сравнить с пропусканием гомогенного раствора такого же количества окрашенного вещества, растворенного во всем объеме объекта  $SL$ , где  $L$  — толщина объекта

$$T_x = I_x / I_0. \quad (1.27)$$

Количество окрашенного вещества одинаково в обоих случаях и равно

$$c_a S_a l = c S L, \quad (1.28)$$

где  $c_a$  и  $c$  — концентрация вещества в частицах и гомогенном растворе соответственно;  $l$  — толщина частиц.

Умножив обе части уравнения (1.28) на  $\epsilon$ , получим

$$D_a S_a = D_x S, \quad (1.29)$$

где  $D_a$  и  $D_x$  — оптическая плотность частиц и однородного раствора соответственно.

Оптическая плотность  $D$  неоднородного образца может быть рассчитана, если известны отношение  $S_a/S$  и одна из величин:  $D_a$  или  $D_x$ . Рассмотрим случай, когда известны оптическая плотность поглощающих частиц  $D_a$  и относительная площадь, перекрываемая частицами  $S_a/S$ . Найдём

$$T_a = 10^{-D_a}. \quad (1.30)$$

затем пропускание  $T$  по уравнению (1.26) и, наконец, оптическую плотность образца по формуле

$$D = -\lg T. \quad (1.31)$$

Отношение  $D/D_x$  может характеризовать эффект сита;  $D_x$  находим по уравнению (1.29). На рис. 1.12 приведены зависимости  $D/D_x$  от  $D_a$  при разных значениях  $S_a/S$ , из которого следует, что

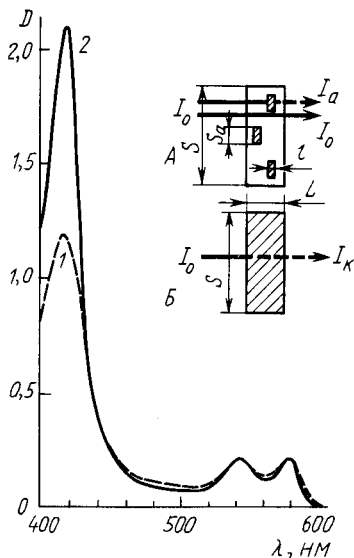


Рис. 1.11. Эффект сита в суспензии эритроцитов:

1 — спектр поглощения суспензии эритроцитов; 2 — тот же образец после гемолиза; А — прохождение пучка света через суспензию эритроцитов; Б — через гемолизат

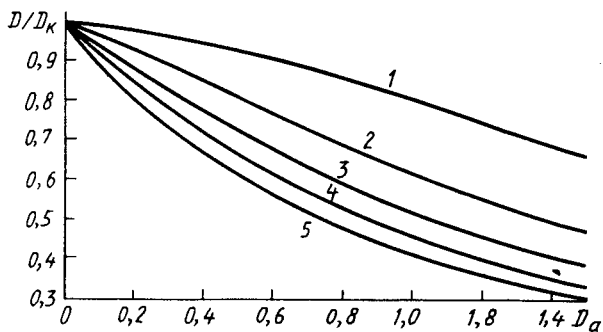


Рис. 1.12. Зависимость эффекта сита от неравномерности распределения поглощающего вещества  $S_a/S$  и оптической плотности частиц  $D_a$ :

$D$ ,  $D_k$  и  $D_a$  — оптические плотности суспензии частиц, однородного раствора того же хромофора и отдельно взятой суспендированной частицы соответственно; отношение  $S_a/S$  составляло 0,9 (1), 0,7 (2), 0,5 (3), 0,3 (4) и 0,1 (5)

эффект сита сказывается тем сильнее, чем больше неравномерность распределения поглощающего вещества (т. е.  $S_a/S$ ) и чем выше оптическая плотность частиц (т. е.  $D_a$ ).

Какова же реальная оптическая плотность для частиц в суспензии, например, эритроцитов? Эритроциты представляют собой плоские диски диаметром 8 и толщиной 2 мкм. Гемоглобин ( $M_r = 68\,000$ ) составляет  $\sim 30\%$  массы эритроцитов. Молярные коэффициенты поглощения оксигемоглобина равны  $\epsilon_{540} = 1,5 \cdot 10^4$  и  $\epsilon_{418} = 1,2 \cdot 10^5$  л · моль $^{-1}$  · см $^{-1}$ . Молярная концентрация гемоглобина в эритроцитах  $4,5 \cdot 10^{-3}$  моль · л $^{-1}$ . Если эритроцит расположен плоской стороной перпендикулярно к лучу, то по закону Бугера — Ламберта — Бера  $D_{540} = 0,014$  ( $T_{540} = 97\%$ ) и  $D_{418} = 0,11$  ( $T_{418} = 77\%$ ). Если эритроцит повернут плоской стороной параллельно лучу света, то  $D_{540} = 0,056$  ( $T_{540} = 88\%$ ), а  $D_{418} = 0,44$  ( $T_{418} = 36\%$ ). Таким образом, в зависимости от ориентации эритроциты пропускают в максимуме поглощения 418 нм всего 36—77% света, а в максимуме 540 нм — 88—97%. Из этих данных видно, что в синей области спектра (в полосе Сорэ) эритроцит поглощает значительную долю падающего на него светового потока.

В результате оптическая плотность суспензии оказывается ниже, чем оптическая плотность раствора оксигемоглобина, что имеет место лишь в области  $\sim 418$  нм, где  $D_a$  велика.

В итоге как многократное светорассеяние, так и эффект сита приводят к сглаживанию спектров поглощения. В максимумах, где сильнее сказывается эффект сита, оптическая плотность занижается, а минимумы за счет многократного рассеивания повышаются.

В некоторых случаях количественную оценку содержания поглощающего свет вещества в образце проводят, регистрируя не спектры поглощения, а спектры отражения. Так, например,

оценивают содержание гемоглобина в коже. Падающий монохроматический свет ( $I_0$ ), проникая в кожу, ослабляется за счет поглощения. Часть света после многократного рассеяния клетками кожи выходит обратно — отражается. Отношение интенсивности отраженного света ( $I$ ) к падающему называется отражательной способностью  $R=I/I_0$ . При эритеме, когда резко усиливается микроциркуляция и повышается содержание гемоглобина в коже, уменьшается отражательная способность в области поглощения гемоглобина ( $\sim 540$  и  $578$  нм) служит количественным критерием эритемы (рис. 1.13).

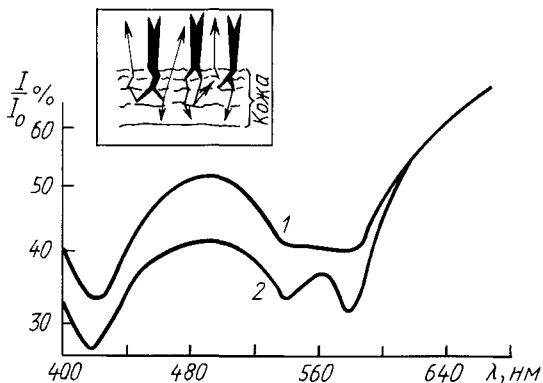


Рис. 1.13. Спектры отражения кожи человека: 1 и 2 — участок кожи до и после развития УФ-В эритемы; на вставке показан путь света в коже

## ГЛАВА 2

### ФОТОЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМ

#### 2.1. Явление люминесценции

При поглощении фотона электрон переходит на одну из свободных орбиталей (или на новый энергетический уровень) и молекула оказывается в возбужденном состоянии. Таких уровней может быть несколько, и молекула может оказаться на любом из них, в зависимости от того, какой была длина волны действующего излучения (см. рис. 1.1).

Обратный переход на основную орбиталь приводит к уменьшению энергии системы, которая может выделиться по частям, растратившись на колебательные движения ядер и поступательное движение молекул растворителя, т. е. теплоту, или же эта энергия возбужденного состояния может выделиться одной порцией в виде кванта люминесценции.

Важно отграничить явление люминесценции от других способов излучения света молекулами. По предельно сжато и точному определению С. И. Вавилова, люминесценцией тела в данной спектральной области называют избыток излучения над температурным при условии, что это избыточное излучение обладает конечной длительностью, превышающей период световых колебаний.

Образование электронно-возбужденных молекул может быть не только результатом поглощения ими квантов света, но и следствием химических реакций, электрического разряда и др. Поэтому в зависимости от источника энергии при возбуждении молекул говорят о разных типах люминесценции.

Люминесценцию, возникшую в результате освещения молекул, называют *фотолюминесценцией*\*. Свечение, сопровождающее химические реакции,— *хемилюминесценция*; слабая хемилюминесценция сопровождается, например, свободнорадикальное цепное окисление органических соединений, включая липиды. Многие живые организмы, например светляки, бактерии, некоторые морские организмы, способны испускать довольно сильный свет в результате определенных биохимических реакций; такое свечение называют *биолюминесценцией*. В физике известны явления *термолюминесценции*, *электролюминесценции*, *сонолюминесценции*, *триболюминесценции*. Эти термины указывают на то, что причиной образования электронно-возбужденных молекул в этих случаях является нагревание образцов, пропускание электрического тока, воздействие ультразвуком, трение поверхностей.

## 2.2. Электронные переходы в возбужденной молекуле и основные законы люминесценции

В исходном (невозбужденном) состоянии молекулы находятся на самом нижнем из возможных энергетических уровней (см. рис. 1.1), т. е. на нижнем колебательном подуровне основного состояния. У органических молекул, имеющих систему сопряженных двойных связей, это состояние синглетное, при котором спины электронов на верхней заполненной орбитали антипараллельны ( $S_0$ ). Вероятность самопроизвольного перехода молекулы на более высокий энергетический уровень за счет тепловой энергии молекул определяется уравнением Больцмана

$$n/n_0 = e^{-\Delta E/kT}, \quad (2.1)$$

где  $n_0$  и  $n$ —число молекул в основном и возбужденном состояниях;  $\Delta E$ —разница энергий уровней;  $k$ —постоянная Больцмана;  $T$ —абсолютная температура.

Например, в молекуле фенилаланина  $\Delta E$  для ближайших колебательных подуровней  $\approx 0,1$  эВ (при  $300\text{ K}$   $0,1\text{ эВ} \approx 4\text{ kT}$ ). Отсюда находим, что  $n/n_0 = 0,018$ . Заселенность вышележащих электронных уровней еще ниже, так как  $\Delta E$  между уровнями больше. Таким образом, в состоянии теплового равновесия с окружающей средой практически все молекулы находятся на самом нижнем колебательном подуровне самого нижнего электронного уровня.

\* В данной книге в основном рассматриваются вопросы фотолюминесценции, для краткости в дальнейшем будем пользоваться термином люминесценция.

Из основного состояния  $S_0$  молекула может перейти на разные колебательные подуровни высележащих электронных орбиталей (электронных уровней возбужденного состояния)  $S_1$ ,  $S_2$  и т. д., поглотив фотоны соответствующей энергии. Таким образом, длина стрелок вверх на рис. 1.1 позволяет найти частоты и длины волн максимумов тонкой структуры спектров поглощения молекул по уравнению (1.1). Обычно приходится решать обратную задачу: зная структуру спектра поглощения, строить схему электронных уровней (если спектр достаточно разрешенный — то и колебательных подуровней) молекул в возбужденном состоянии.

Поглощение фотона происходит за время порядка  $10^{-15}$  с, в течение следующих  $10^{-12}$  с устанавливается тепловое равновесие возбужденной молекулы с окружающей средой. В состоянии равновесия относительная заселенность подуровней в возбужденном состоянии, как и в основном, определяется уравнением (2.1). Поэтому фактически за  $10^{-11}$  с происходит растрата части энергии возбужденного состояния на тепловое движение окружающих молекул (диссипация части энергии фотона в теплоту). На схеме рис. 1.1 это выглядит как переход  $BK$  с разных колебательных подуровней на нижний колебательный подуровень нижнего из возбужденных состояний.

В люминесцирующих молекулах возбужденное (синглетное) состояние относительно устойчиво: электрон может находиться на орбитали в возбужденном состоянии до  $10^{-9}$ — $10^{-8}$  с. В отсутствие переноса энергии на другие молекулы и фотохимической реакции обратный переход возбужденной молекулы в основное состояние может происходить тремя путями.

1. Электрон переходит с орбитали возбужденного состояния  $S_1$  на орбиталь основного состояния  $S_0$ , при этом высвечивается квант света флуоресценции. Так как такой переход может происходить на разные колебательные подуровни основного состояния, то в спектре флуоресценции возможна тонкая структура, которая размывается в полярных растворителях.

2. Энергия возбужденного состояния постепенно растрчивается на тепловые движения молекул. Квант света при электронном переходе с возбужденного уровня на основной не высвечивается (переход  $BK$  с уровня  $S_1$  на уровень  $S_0$ ). Такой электронный переход называют безызлучательным.

3. Происходит обращение спина электрона на орбитали  $S_1$ . Молекула переходит в триплетное состояние  $T_1$ , энергия которого несколько ниже энергии синглетного. Поскольку прямой переход из триплетного состояния в основное синглетное запрещен, т. е. маловероятен, молекула может находиться в триплетном состоянии сравнительно длительное время от  $10^{-4}$  с до нескольких секунд. При обычных температурах в жидкой фазе за это время происходит тепловая диссипация энергии возбужденного триплетного состояния — безызлучательный переход в основное состояние

$T_1 \rightarrow S_0$ . Но в растворах, замороженных жидким азотом, и даже при комнатных температурах, но в твердых образцах может наблюдаться излучательный переход  $T_1 \rightarrow S_0$ , сопровождающийся высвечиванием кванта фосфоресценции.

Схема на рис. 1.1 позволяет объяснить эмпирические законы люминесценции, которые и послужили основой для создания самой схемы. Это закон Стокса, правило Каши, правило Левшина, закон Вавилова. Остановимся на определении этих законов.

Спектром люминесценции (флуоресценции или фосфоресценции) называют зависимость

$$I_n = f(\lambda) \text{ или } I_n = f(\nu), \quad (2.2)$$

где  $I_n$  — интенсивность света люминесценции в относительных единицах, измеренная при длине волны  $\lambda$ .

Согласно *закону Стокса* спектр флуоресценции лежит в более длинноволновой области по сравнению со спектром поглощения того же соединения. Это означает, что средняя энергия квантов флуоресценции меньше средней энергии поглощенных квантов. На рис. 1.1 данная закономерность проявляется в том, что длина прямых стрелок вверх (электронные переходы при поглощении света) в среднем больше длины стрелок, направленных вниз (электронные переходы при флуоресценции и фосфоресценции). Причина такого явления уже была рассмотрена выше — это превращение части энергии поглощенного фотона в тепловую энергию окружающих молекул.

*Правило Каши* относится к форме спектра флуоресценции при возбуждении объекта светом разных длин волн. Испускание квантов флуоресценции всегда происходит с нижнего возбужденного уровня молекулы, независимо от того, на какой уровень был заброшен перед этим электрон в результате поглощения фотона. Это означает, что какой бы длиной волны ни была возбуждена молекула (разные вертикальные стрелки вверх на схеме), излучение будет происходить из одного и того же состояния молекулы и спектр флуоресценции во всех случаях будет одинаковым. Следовательно, спектр флуоресценции (и фосфоресценции) не зависит от длины волны возбуждающего излучения.

*Правило Каши* и закон Стокса имеют большое значение при проведении спектрофлуориметрических измерений. В соответствии с законом Стокса для возбуждения люминесценции используют излучение с длинами волн, меньшими коротковолновой границы спектра флуоресценции. Благодаря этому рассеянный объектом возбуждающий свет может быть полностью убран при помощи светофильтров или монохроматора и не мешает регистрации люминесценции (см. раздел 2.5). Если в растворе люминесцирует одно вещество, то (*правило Каши*) на форме спектра люминесценции длина волны люминесценции возбуждения не сказывается. Это позволяет использовать спектрофлуориметрию для качественного и количественного анализов люминесцирующих веществ.

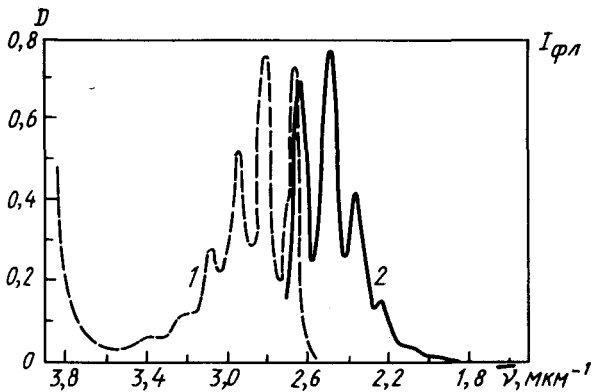


Рис. 2.1. Спектры поглощения (1) и флуоресценции (2) антрацена (1 мкг/мл) в этаноле

*Правило Левшина*, называемое также *правилом зеркальной симметрии*, утверждает, что спектры флуоресценции по форме зеркально симметричны длинноволновой полосе спектра поглощения, если они построены в шкале частот (энергий). Иллюстрацией этого правила могут служить спектры поглощения и флуоресценции антрацена, приведенные на рис. 2.1\*. Такое явление можно объяснить тем, что свойства молекулы, в частности расстояние между колебательными подуровнями и вероятности переходов на них, близки у молекул в основном в электронно-возбужденном состоянии. Это говорит о том, что геометрия молекул в электронно-возбужденном состоянии мало изменяется по сравнению с основным состоянием. Обратимся к рис. 1.1. Электронные переходы из основного состояния на подуровни 0', 1' и 2' нижнего возбужденного электронного уровня характеризуются вероятностями перехода  $k_{00'}$ ,  $k_{01'}$ ,  $k_{02'}$  и энергиями перехода  $E_{00'}$ ,  $E_{01'} = E_{00'} + E_{0'1'}$  и  $E_{02'} = E_{00'} + E_{0'2'}$ . Эти переходы, выраженные в виде максимумов тонкой структуры в спектре поглощения, соответствуют переходам при люминесценции с уровня 0' на подуровни 0, 1, 2 основного состояния. Такие переходы характеризуются вероятностями  $k_{0'0}$ ,  $k_{0'1}$  и  $k_{0'2}$ , а также энергиями  $E_{0'0}$ ,  $E_{0'1} = E_{0'0} - E_{01}$  и  $E_{0'2} = E_{0'0} - E_{02}$ . При равенствах  $k_{0'0} = k_{00'}$ ,  $k_{0'1} = k_{01'}$ , и  $k_{0'2} = k_{02'}$ ;  $E_{01} = E_{0'1'}$ ,  $E_{02} = E_{0'2'}$  и  $E_{03} = E_{0'3'}$ , получаем строго зеркально-симметричные спектры поглощения и испускания. В действительности возбужденные молекулы имеют несколько измененную структуру колебательных подуровней по сравнению с молекулой в основном состоянии, и закон зеркальной симметрии несколько нарушается.

\* Интенсивность люминесценции здесь и далее выражается в относительных единицах.

*Закон Вавилова* заключается в том, что квантовый выход флуоресценции не зависит от длины волны возбуждения люминесценции. Квантовым выходом люминесценции называют отношение числа квантов, высвеченных в виде люминесценции, к числу поглощенных образцом квантов. Очевидно, что эта величина может принимать значения от 0 до 1. От чего зависит квантовый выход? Всякое поглощение кванта света приводит к образованию молекулы в возбужденном состоянии (см. рис. 1.1), т. е. в состоянии  $S_1$ . Иными словами, вероятность перехода молекулы из состояния  $S_0$  в состояние  $S_1$  при поглощении фотона равна единице и не зависит от длины волны поглощенного фотона. Излучательный переход молекулы с нижнего подуровня возбужденного состояния происходит с вероятностью  $\phi$ , меньшей единицы, и сопровождается высвечиванием кванта флуоресценции. Очевидно, что  $\phi$  и есть квантовый выход флуоресценции. Он меньше единицы, поскольку есть некоторая вероятность  $(1 - \phi)$  безызлучательных переходов в основное состояние непосредственно или через триплетное состояние, а также других способов растраты энергии.

### 2.3. Электронные переходы и колебания ядер. Принцип Франка—Кондона

Связь между электронными переходами и изменением колебательной энергии в молекулах удобно рассматривать, используя график зависимости потенциальной энергии молекулы в основном и возбужденном состояниях от межъядерных расстояний (рис. 2.2). Для многоатомной молекулы, состоящей из  $n$  атомов, аналогичную схему можно изобразить только как  $(3n - 6)$ -мерную гиперповерхность. Чтобы, например, изобразить полностью колебательные движения ядер в молекуле антрацена, потребовалось бы 66-мерное гиперпространство. Поэтому схему на рис. 2.2 можно рассматривать как зависимость потенциальной энергии только от одного критического межъядерного расстояния в многоатомной молекуле. Это упрощает задачу, но позволяет понять многие важные процессы в возбужденных молекулах.

Кривая  $S_0$  (рис. 2.2) соответствует потенциальной энергии системы в основном состоянии, тонкие горизонтальные линии обозначают полные энергии колебательных уровней (0, 1, 2 и т. д.). Величина кинетической энергии соответствует расстоянию от горизонтальных линий до потенциальной кривой по вертикали. Сумма потенциальной и кинетической энергии для молекулы на каждом колебательном уровне сохраняется постоянной.

Потенциальная кривая электронно-возбужденного состояния ( $S_1$ ) лежит над кривой  $S_0$  на высоте, равной энергии электронного возбуждения.



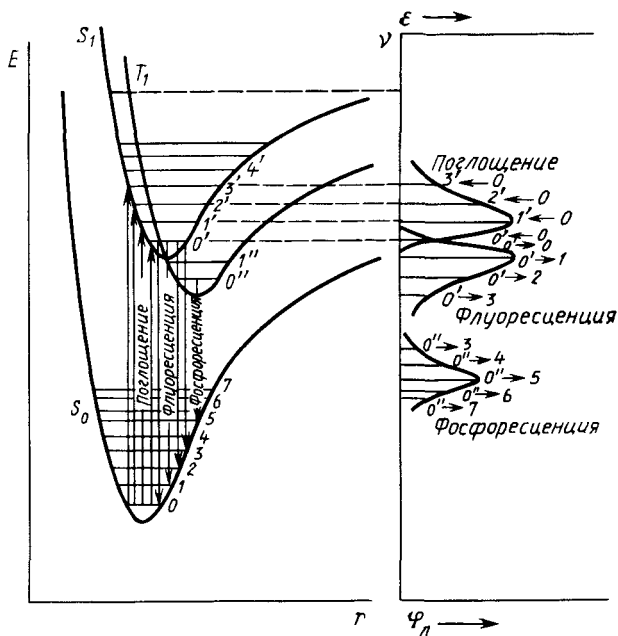


Рис. 2.2. Принцип Франка — Кондона

Обычно положение равновесия в возбужденном состоянии (середина отрезка, обозначающего нулевой колебательный уровень  $0'$ ) отвечает большему межъядерному расстоянию, чем для основного состояния (середина отрезка  $0$  состояния  $S_0$ ).

В момент поглощения света молекула может иметь различные значения кинетической и потенциальной энергии, т. е. может находиться в различных точках нижнего колебательного уровня, но наиболее вероятное положение молекулы соответствует середине отрезка, обозначающего нулевой колебательный уровень. Переход именно из этого положения будет характеризоваться максимальным значением  $\epsilon$  (рис. 2.2), что соответствует переходу  $1' \leftarrow 0$ . Другие переходы будут менее вероятны. С уменьшением межъядерного расстояния потенциальная кривая становится круче, поэтому интенсивность в спектре поглощения падает в направлении коротких длин волн более полого, чем с длинноволновой стороны, максимума. После возбуждения молекула переходит на верхний колебательный уровень (например,  $3'$ ), а затем она быстро теряет избыток колебательной энергии и «спускается» на самый нижний колебательный уровень возбужденного состояния. Излучательный переход из середины нулевого колебательного уровня в основное состояние  $S_0$  представлен в виде стрелки  $0' \rightarrow 1$ . Форма спектров испускания зависит от относительного расположения минимумов двух потенциальных кривых и от конфигурации этих

кривых. Для большинства веществ кривые не очень сдвинуты относительно друг друга по оси абсцисс, и справа от самого интенсивного перехода (от стрелки  $0' \rightarrow 1$ ) кривая основного состояния идет несколько круче, чем слева. Поэтому в направлении длинных волн интенсивность флуоресценции спадает более полого, чем в направлении коротких длин волн.

Согласно принципу Франка—Кондона все электронные переходы (как поглощательные, так и излучательные) на потенциальных кривых должны изображаться вертикальными линиями, так как за время таких переходов ( $10^{-15}$  с) взаимное расположение ядер не успевает изменяться.

#### 2.4. Связь интенсивности люминесценции с концентрацией вещества. Люминесцентный анализ

Качественный люминесцентный анализ основан на сравнении формы спектров исследуемой смеси веществ с формой спектра индивидуальных соединений, которые могут входить в состав изучаемой смеси. По причинам, изложенным ниже, необходимо использовать растворы с низкой оптической плотностью (например, меньше 0,1), в противном случае требуется учитывать эффекты экранировки и реабсорбции (см. разд. 2.8). Как и в случае абсорбционной спектрофотометрии, для идентификации флуоресцирующего вещества наибольшее значение имеют положение максимума, наличие и характер тонкой структуры спектров, полуширина полос флуоресценции. Важная особенность флуоресценции смеси нескольких соединений состоит в том, что спектр смеси изменяется при изменении длины волны возбуждения, поскольку при разных длинах волн могут преимущественно возбуждаться разные соединения.

Перейдем к количественному определению флуоресцирующего вещества в растворе. Предположим, что на кювету с раствором флуоресцирующего вещества падает монохроматический пучок света с мощностью 1,0 эйнштейн/с. Количество поглощенной световой энергии в соответствии с законом Бугера—Ламберта—Бера равно  $I_0(1-T) = I_0 - I \cdot 10^{-D}$ , где  $D = \epsilon cl$  (1.6). Из общего числа поглощенных фотонов часть, равная квантовому выходу флуоресценции  $\phi$ , выветится образцом в различных направлениях и во всей спектральной области люминесценции. Из этого общего светового потока с помощью светофильтров или монохроматора можно выделить и сфокусировать на приемник света световой поток, который будет зарегистрирован в виде фототока  $I_n$ , т. е.

$$I_n = K \phi I_0(1-T) = K \phi I_0(1 - 10^{-\epsilon cl}), \quad (2.3)$$

где интенсивность люминесценции  $I_n$  пропорциональна интенсивности возбуждающего света  $I_0$ , квантовому выходу люминесценции  $\phi$ , коэффициенту поглощения света  $(1-T)$ . Константа  $K$

зависит от телесного угла, в пределах которого собран свет люминесценции, ширины вырезаемой монохроматором или светофильтром спектральной области, пропускания монохроматора или светофильтра и чувствительности приемника света.

Из уравнения (2.3) видно, что интенсивность люминесценции (как и коэффициент поглощения  $1 - T$ ) не пропорциональна концентрации  $c$  в общем случае. Однако такая пропорциональность соблюдается в образцах с малой оптической плотностью (скажем, при  $D \leq 0,1$ ). При таких условиях можно использовать приближенное выражение для  $I_{\text{л}}$ , которое получается, если разложить предыдущее уравнение в степенной ряд и взять первый член этого ряда:

$$I_{\text{л}} \approx I_0 \cdot 2,3K \phi D = I_0 \cdot 2,3K \phi \varepsilon c l. \quad (2.4)$$

Таким образом, при низких оптических плотностях растворов интенсивность люминесценции пропорциональна концентрации флуоресцирующего вещества. На этом основан количественный флуоресцентный анализ. Необходимо иметь стандартный раствор определяемого соединения с известной концентрацией  $c_{\text{ст}}$ ; измеряются интенсивность флуоресценции такого раствора  $I_{\text{ст}}$  и интенсивность флуоресценции исследуемого раствора  $I$ . Концентрация вещества в исследуемом растворе равна

$$c = c_{\text{ст}} \frac{I}{I_{\text{ст}}}.$$

## 2.5. Приборы для регистрации люминесценции. Флуориметр со светофильтрами

Одно из достоинств метода регистрации люминесценции заключается в том, что для решения многих биологических задач не требуется использование сложных и дорогих приборов. Если не требуется проведения точных спектральных измерений или применения техники исследования быстро протекающих процессов, а требуется измерить интенсивность флуоресценции при возбуждении и регистрации в относительно широкой области спектра, то можно использовать простейший флуориметр со светофильтрами типа выпускаемого в СССР ЭФ-3М. При измерении люминесценции существенным является выбор светофильтров, необходимых для разделения света, возбуждающего люминесценцию, и света люминесценции. Светофильтр для возбуждения люминесценции должен пропускать свет только в области поглощения исследуемого вещества и не должен пропускать свет в области, в которой образец люминесцирует. Светофильтр для люминесценции должен пропускать люминесценцию, но возбуждающий свет должен полностью им поглощаться. Подбирая такую пару светофильтров, следует добиваться их хорошей скрещенности: сложенные вместе

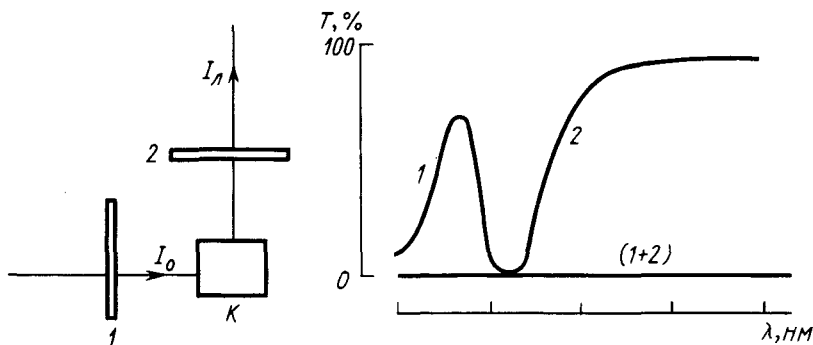


Рис. 2.3. Использование скрещенных светофильтров для измерения люминесценции:

$K$  — кювета с образцом; 1 — светофильтр на пути возбуждающего света; 2 — светофильтр для выделения люминесценции; (1+2) — суммарный спектр пропускания скрещенных светофильтров

эти два светофильтра не должны пропускать свет совсем (рис. 2.3). При перестановке скрещенных светофильтров фототок фотоэлемента или фотоумножителя, обусловленный люминесценцией, должен исчезать (закон Стокса!). Небольшие доработки заводского прибора позволяют резко расширить его возможности.

Установив одну поляроидную пленку на пути возбуждающего света перед кюветой и используя две сменные поляроидные пленки после кюветы, можно измерять на ЭФ-3М также величины поляризации люминесценции (см. разд. 2.14). Безусловно, целесообразно вывести электрический сигнал со стрелочного прибора на самописец: это позволит изучать кинетику процесса, пользуясь проточными кюветами или используя магнитную мешалку.

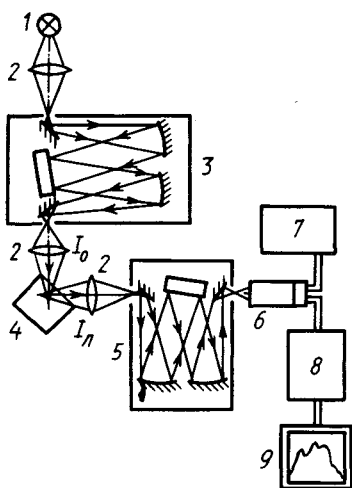


Рис. 2.4. Схема спектрофлуориметра:

1 — лампа; 2 — линзы; 3 и 5 — монохроматоры; 4 — кювета с образцом; 6 — ФЭУ; 7 — блок питания ФЭУ; 8 — усилитель; 9 — самописец;  $I_0$  — возбуждающий свет;  $I_L$  — люминесценция образца

*Спектрофлуориметры* предназначены для регистрации спектров люминесценции или спектров возбуждения люминесценции. Чаще всего они состоят из двух монохроматоров; один — для выделения монохроматического возбуждающего света, другой — для измерения спектра люминесценции (рис. 2.4). Коммерческие приборы, как правило, снабжены кварцевыми кюветами толщиной 1 см, угол между направлениями возбуждения и люминесценции равен

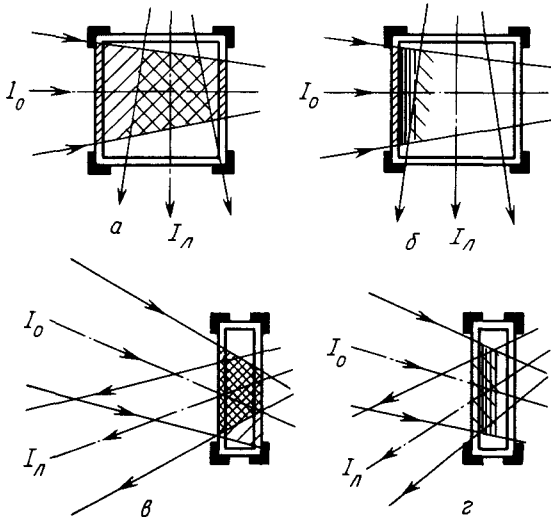


Рис. 2.5. Два способа измерения люминесценции: *а, б* — под прямым углом к возбуждающему пучку света; *в, г* — с передней стенки кюветы, *а, в* — разбавленные и *б, г* — концентрированные образцы

90°. Такое расположение направления возбуждающего пучка и измеряемого света люминесценции позволяет собирать значительную часть света люминесценции и, что не менее важно, исключить люминесценцию самой кюветы (рис. 2.5, *а*), так как флуоресценция стенок не попадает на фотоприемник. Однако эта конструкция предполагает измерение не рассеивающих свет образцов с малой оптической плотностью. В образцах с высокой оптической плотностью осветится только тонкий слой раствора, примыкающий к передней стенке кюветы (рис. 2.5, *б*) и свет люминесценции не измеряется.

Чтобы избежать это явление, в случае образцов с высокой оптической плотностью используют тонкие кюветы, а измерение флуоресценции проводят с той стороны кюветы, на которую падает возбуждающее излучение (рис. 2.5, *в, г*). При измерении растворов с малой оптической плотностью такая схема измерения спереди не дает преимуществ по сравнению с измерением сбоку, поскольку флуоресценция кюветы регистрируется вместе с флуоресценцией

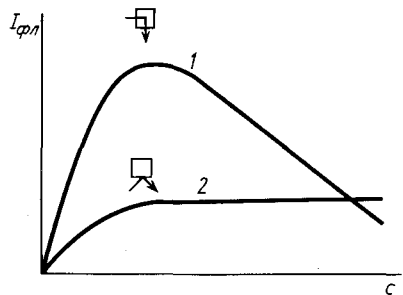


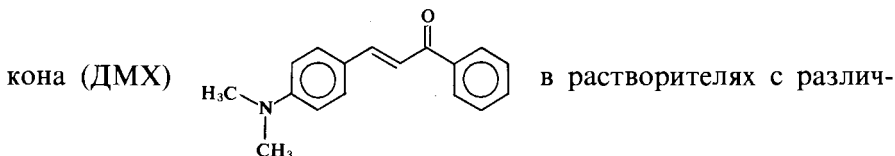
Рис. 2.6. Зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации вещества при регистрации с боковой (1) и с передней (2) стенки кюветы

раствора и, следовательно, возрастают требования к материалу кювет. Зато увеличение оптической плотности образца в этом случае не сопровождается снижением интенсивности измеряемой люминесценции (рис. 2.6).

При измерениях люминесценции вследствие низкой интенсивности измеряемого монохроматического света люминесценции возрастают требования к светосиле спектральных приборов, чувствительности приемника света, отсутствию рассеянного света в монохроматоре. Особое внимание следует обращать на возможную люминесценцию растворителя, примесей к реактивам, кюветы (С. Паркер, 1972; Владимиров Ю. А. и Литвин Ф. Ф., 1964; Лакович Дж., 1986).

## 2.6. Влияние микроокружения на спектры и квантовые выходы люминесценции. Флуоресцентные зонды

Условия среды, окружающей флуоресцирующие молекулы, влияют как на спектры поглощения, так и на спектры флуоресценции; наибольшее значение при этом имеет полярность окружающей молекул и их подвижность. В случае флуоресценции растворов веществ наибольшее влияние имеют диэлектрическая проницаемость и вязкость окружающей среды. В табл. 2.1 даны положения максимумов в спектрах поглощения ( $\lambda_n$ ) и флуоресценции ( $\lambda_{фл}$ ) люминесцирующего соединения диметиламинохал-



ной полярностью (диэлектрической проницаемостью  $\epsilon$ ). Видно, что с увеличением полярности растворителя максимумы в спектре поглощения и, особенно, в спектре флуоресценции сдвигаются в область больших длин волн. Объяснение этому явлению дано на рис. 2.7.

Молекула ДМХ в основном состоянии имеет относительно небольшой дипольный момент  $\mu_0 \approx 17 \cdot 10^{-30}$  Кл·м и, соответственно, умеренно сольватирована, т. е. окружена ориентированными полярными молекулами растворителя, например воды (рис. 2.7, 1). Поглощение фотона и переход молекулы в возбуж-

Таблица 2.1. Максимумы поглощения и флуоресценции зонда ДМХ в разных растворителях

Растворитель	Диэлектрическая проницаемость $\epsilon$	$\lambda_n$ , нм	$\lambda_{фл}$ , нм
Гептан	1,9	383	436
Толуол	2,4	402	472
Бутанол	17,7	418	545
Метанол	32,7	418	547
Вода	80	427	560

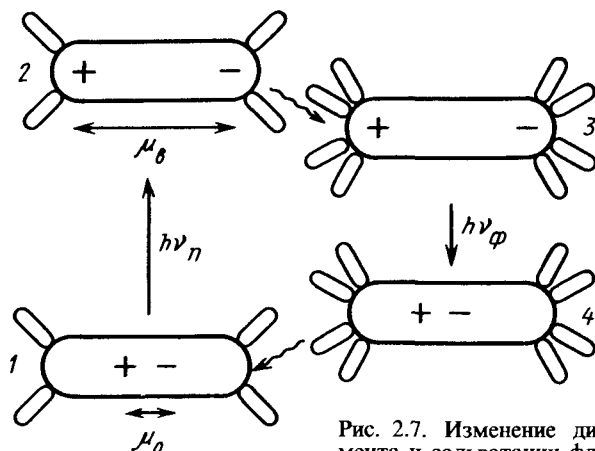


Рис. 2.7. Изменение дипольного момента и сольватации флуоресцентного зонда ДМХ после поглощения фотона или испускания фотона флуоресценции: большими и малыми овалами схематически обозначены молекулы ДМХ и сольватирующего растворителя

денное состояние сопровождаются увеличением дипольного момента молекулы  $\mu_a \approx 77 \cdot 10^{-30}$  Кл·м (рис. 2.7, 2). Это приводит к поляризации электронных оболочек окружающих молекул, индукционному смещению их атомов за  $10^{-12}—10^{-13}$  с и переориентации окружающих молекул (росту сольватации, рис. 2.7, 3), что занимает уже  $10^{-11}—10^{-8}$  с. Растрата энергии на все эти процессы приводит к длинноволновому сдвигу полосы флуоресценции (короткая стрелка при переходе 3—4 на рис. 2.7).

Дипольный момент при возбуждении может изменяться в любую сторону как по величине, так и по направлению, однако практически во всех случаях, представляющих биологический интерес, он возрастает. В эксперименте всегда наблюдают, что положение полосы флуоресценции зависит от растворителя гораздо сильнее, чем положение полосы поглощения. Например, для триптофана спектр поглощения практически не зависит от полярности растворителя (рис. 2.8), тогда как спектр флуоресценции сдвигается при переходе от неполярного к полярному растворителю примерно на 20 нм в длинноволновую сторону (рис. 2.9). Очевидно, что этот сдвиг будет выше при следующих условиях: а) большое значение разности  $\mu_a—\mu_0$ ; б) окружающие молекулы имеют высокий дипольный момент; в) подвижность окружающих молекул (текучесть среды) и время жизни возбужденных молекул  $\tau$  достаточно велики, чтобы за время  $\tau$  молекулы среды успели переориентироваться.

Таким образом, разница между максимумами поглощения и флуоресценции (сдвиг по закону Стокса) будет выше в случае зондов со значительной разностью  $\mu_a—\mu_0$ , большим временем жизни возбужденного состояния и в маловязкой, полярной среде.

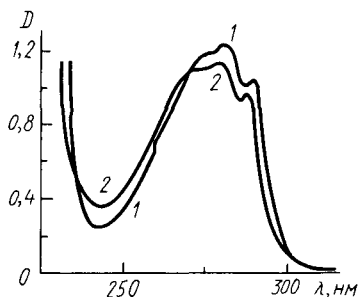


Рис. 2.8. Спектры поглощения триптофана в воде (1) и в 80%-ном диоксане (2)

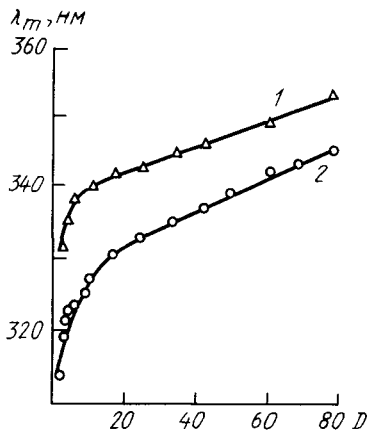
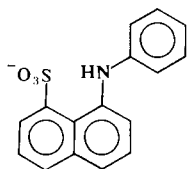


Рис. 2.9. Зависимость положения максимумов спектров флуоресценции триптофана (1) и индола (2) в водно-диоксановых смесях:  
 $D$  — диэлектрическая постоянная смеси

Явление длинноволнового сдвига спектра флуоресценции в полярном, вязком окружении лежит в основе применения флуоресцирующих красителей (зондов). *Флуоресцентным зондом* называют флуоресцирующую молекулу, которая связывается с белками, биологическими мембранами или другими компонентами клетки нековалентными связями. В качестве зондов используют соединения, параметры люминесценции которых резко меняются в зависимости от свойств среды. Поэтому, зная локализацию зонда в клетке, можно по люминесценции судить о физических свойствах непосредственного микроокружения молекул зонда, т. е. о свойствах белков, мембран, нуклеиновых кислот и других структур клеток. В некоторых случаях компоненты клеток (например, белки, жирные кислоты и т. д.) ковалентно связывают (метят) с флуоресцирующими соединениями, в этих случаях используют термин *флуоресцентные метки* (Владимиров Ю. А. и Добрецов Г. Е., 1980; Добрецов Г. Е., 1987).

Изменение свойств среды, окружающей люминесцирующие молекулы, отражается не только на спектрах, но и на квантовом выходе люминесценции. В некоторых случаях различия в квантовом выходе бывают весьма значительны. Так, например, квантовый выход флуоресценции красителя 1-анилинонафтален-8-сульфоната (АНС)





в бутаноле равен 0,66, а в воде—0,004; соответственно этому время затухания флуоресценции составляет в пропаноле 10,5 нс, а в воде— всего 0,55 нс.

Будучи включенным в липидный слой мембран (липосомы из димиристоиллецитина), краситель показывает довольно высокий квантовый выход флуоресценции  $\phi = 0,29$  и  $\tau = 7,0$  нс. При переходе красителя из водной в мембранную фазу квантовый выход флуоресценции АНС возрастает на  $\sim 2$  порядка. В суспензии мембран флуоресценция красителя обусловлена практически только той его частью, которая связалась с мембранами (встроилась в липидный слой); это позволяет изучать связывание с липидами (и белками) мембран АНС, который может считаться люминесцентным зондом на наличие гидрофобной фазы. Но, поскольку АНС имеет отрицательный заряд, его связывание с мембранами зависит от поверхностного заряда мембран: с ростом положительного заряда связывание растет, с ростом отрицательного—падает. Тем самым АНС можно использовать также и в качестве зонда на наличие заряда на мембранах и на белковых макромолекулах.

## 2.7. Спектры возбуждения люминесценции

Если возбуждение люминесценции осуществляется монохроматическим светом, выделяемым с помощью монохроматора (см. рис. 2.4), то появляется возможность измерить зависимость интенсивности люминесценции от длины волны возбуждающего света. Характер этой зависимости станет ясен при анализе уравнения (2.3). Прежде всего интенсивность люминесценции зависит от интенсивности возбуждающего излучения ( $I_0$ ), которая изменяется с длиной волны в соответствии со спектральным распределением излучения источника света и свойствами монохроматора возбуждения (см. рис. 2.4). Приведенным спектром возбуждения назовем функцию

$$I_\lambda / I_0 = f(\lambda), \quad (2.5)$$

где интенсивность монохроматического возбуждающего света  $I_0$  при длине волны  $\lambda$  выражена числом фотонов/с или эйнштейнов/с.

Из уравнения (2.3) следует, что

$$I_n / I_0 = K \phi (1 - T). \quad (2.6)$$

Поскольку квантовый выход флуоресценции  $\phi$  для конкретного флуоресцирующего вещества, согласно закону Вавилова, от длины волны возбуждения не зависит (равно как и константа  $K$ ), ясно, что форма спектра возбуждения повторяет форму зависимости от длины волны коэффициента поглощения, т. е. функции

$$1 - T = f(\lambda), \quad (2.7)$$

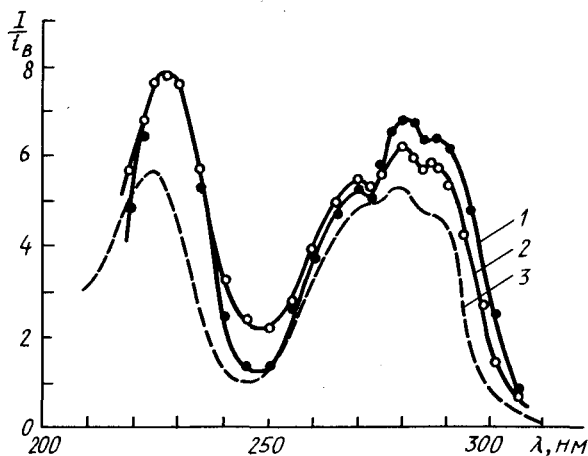


Рис. 2.10. Спектры возбуждения флуоресценции ( $\lambda_{\text{фл}} = 350$  нм) целых клеток (1), митохондрий (2) и спектр поглощения белков (3)

где  $\lambda$  — длина волны возбуждающего света.

Для образцов с низкой оптической плотностью уравнение (2.3) переходит в уравнение (2.4), откуда

$$I_n/I_0 \approx 2,3K\varphi D.$$

Так как  $\varphi$  и  $K$  — постоянные, то можно сказать, что спектр возбуждения флуоресценции в разбавленных растворах совпадает (по форме) со спектром поглощения флуоресцирующего соединения.

Совпадение спектра возбуждения люминесценции с абсорбционным спектром люминесцирующего соединения может наряду со спектром люминесценции использоваться для идентификации люминесцирующих молекул в системе. Так, спектр возбуждения ультрафиолетовой флуоресценции живых клеток и митохондрий совпадает по форме со спектром поглощения ароматических аминокислот белков (рис. 2.10). Это говорит о том, что именно белки флуоресцируют в клетках в этой области. Однако возможен перенос энергии электронного возбуждения на другие молекулы-акцепторы. В этом случае (см. гл. 3) спектр возбуждения акцептора будет приближаться к сумме спектров поглощения обоих веществ.

## 2.8. Эффект экранировки люминесценции

При изучении люминесценции сложных систем, таких, как целые ткани, суспензии клеток, многокомпонентные растворы, могут быть допущены ошибки как при измерении спектров

люминесценции, так и при измерении интенсивности и спектров возбуждения. Оптические артефакты, приводящие к искажениям спектров люминесценции и возбуждения люминесценции, связаны в основном с двумя явлениями: *экранирующим эффектом* и *эффектом реабсорбции*, называемыми также *эффектами внутреннего фильтра*.

Эффект экранировки возбуждающего света связан с поглощением части возбуждающего света посторонними веществами, в результате чего уменьшается количество фотонов, поглощаемых исследуемым веществом. Тем самым снижается интенсивность люминесценции  $I_n$ . Рассчитаем поправочный коэффициент для учета эффекта экранировки, взяв плоскопараллельный образец толщиной  $l$ , на который перпендикулярно падает монохроматический возбуждающий пучок с интенсивностью  $I_0$ . Измерение флуоресценции будем проводить с передней стенки. Выделим в образце элементарный объем толщиной  $dx$  (как это делалось при выводе закона Бугера — Ламберта — Бера), перпендикулярный световому пучку и находящийся на расстоянии  $x$  от передней поверхности образца (рис. 2.11). В пределах самого тонкого слоя  $dx$  экранировкой можно пренебречь. Интенсивность света, падающего на выделенный объем  $[I(x)]$ , по закону Бугера — Ламберта — Бера (1.6) определяются выражением

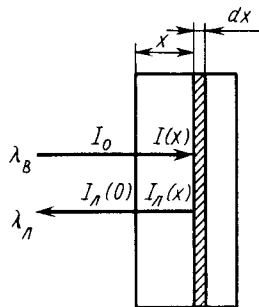


Рис. 2.11. Схема к выводу поправки на эффект реабсорбции

$$I(x) = I_0 \cdot 10^{-\left(\varepsilon c + \sum_i \varepsilon_i c_i\right)x}, \quad (2.8)$$

где  $\varepsilon$  — молярный коэффициент поглощения при длине волны возбуждения;  $c$  — концентрация люминесцирующего вещества;  $\varepsilon_i$  и  $c_i$  — те же параметры для экранирующих веществ. В элементарном объеме число фотонов  $[dI(x)]$ , поглощенных в единицу времени люминесцирующим веществом, при небольших значениях  $dx$  равно [сравните с (2.4)]

$$dI(x) = \ln 10 \cdot I(x) \varepsilon c dx,$$

или с учетом (2.8)

$$dI(x) = \lg 10 \cdot I_0 \varepsilon c \cdot 10^{-\left(\varepsilon c + \sum_i \varepsilon_i c_i\right)x} dx. \quad (2.9)$$

Общее число фотонов  $I_n$ , поглощаемых исследуемым веществом во всем образце в 1 с, можно найти, проинтегрировав уравнение (2.9):

$$I_n = \ln 10 \cdot I_0 \varepsilon c \int_0^l 10^{-\left(\varepsilon c + \sum_i \varepsilon_i c_i\right)x} dx,$$

$$I_n = \frac{I_0 \varepsilon c}{\varepsilon c + \sum_i \varepsilon_i c_i} [1 - 10^{-(\varepsilon c + \sum_i \varepsilon_i c_i) l}],$$

$$I_n = I_0 (1 - 10^{-D_{06}}) \frac{D}{D_{06}}. \quad (2.10)$$

Так как интенсивность люминесценции пропорциональна числу поглощенных фотонов по аналогии с (2.3):

$$I_n = K \varphi I_n, \quad (2.11)$$

то, подставив в (2.11) выражение (2.10), получим

$$I_n = K \varphi I_0 (1 - 10^{-D_{06}}) \frac{D}{D_{06}}.$$

Уравнение (2.3) представляет собой частный случай более общего выражения для интенсивности люминесценции при монокроматическом возбуждении

$$I_n = K \varphi I_0 (1 - T) \frac{D}{D_{06}},$$

в котором отношение  $D/D_{06}$  показывает, какая часть света, поглощенного образцом, была поглощена люминесцирующим компонентом ( $T$  — пропускание образца).

## 2.9. Явление реабсорбции люминесценции

Реоабсорбция — это поглощение квантов люминесценции в толще самого образца. Реабсорбция может происходить в результате поглощения фотонов в антистоксовой области самим люминесцирующим веществом, при этом будет ослабляться интенсивность люминесценции в коротковолновой части спектра (рис. 2.12). В многокомпонентных системах фотоны люминесценции могут поглощаться молекулами других веществ, характер искажений спектра люминесценции в таком случае будет полностью определяться формой спектра поглощения веществ в системе. Эффект реабсорбции увеличивается с возрастанием оптической плотности образца в области регистрации люминесценции. Теоретически эффект реабсорбции можно учесть. Возьмем случай с одним веществом в растворе. Рас-

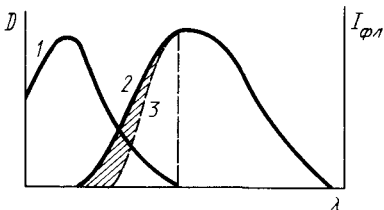


Рис. 2.12. Искажение спектров флуоресценции в результате реабсорбции:

1 — спектр поглощения; 2 и 3 — неискаженный и искаженный соответственно спектры флуоресценции

смотрим люминесценцию элементарного объема малой толщины  $\Delta x$  (см. рис. 2.11). Интенсивность люминесценции этого объема  $\Delta I_n$  находят из (2.3) и (2.9). Так как толщина элементарного объема мала, то эффектами экранировки и реабсорбции внутри слоя  $\Delta x$  можно пренебречь:

$$\Delta I_n(x) = I(x) K \phi \ln \cdot 10 \varepsilon_b c \Delta x, \quad (2.12)$$

где

$$I(x) = I_0 \cdot 10^{-\varepsilon_a c x}. \quad (2.13)$$

Вследствие реабсорбции интенсивность регистрируемой люминесценции уменьшится и, если путь люминесценции в образце принять равным пути возбуждающего света (измерение люминесценции производится с передней стенки кюветы), будет определяться соотношением

$$\Delta I_n(0) = \Delta I_n(x) \cdot 10^{-\varepsilon_a c x}. \quad (2.14)$$

Заметим, что  $\varepsilon_b$  — молярный коэффициент поглощения при длине волны возбуждения, а  $\varepsilon_n$  — молярный коэффициент поглощения вещества при длине волны измерения люминесценции. Чтобы получить выражение для интенсивности люминесценции от всего образца, объединим уравнения (2.12) — (2.14)

$$\Delta I_n(0) = I_0 K \phi \ln 10 \varepsilon_b c \cdot 10^{-(\varepsilon_a + \varepsilon_n) c x} \Delta x,$$

а затем перейдем к бесконечно малым приращениям и осуществим интегрирование в области  $x$  от 0 до  $l$ :

$$I_n(0) = I_0 K \phi \left[ 1 - 10^{-(D_b + D_n)} \right] \frac{D_b}{D_b + D_n}. \quad (2.15)$$

Здесь  $D_b$  и  $D_n$  — оптическая плотность раствора в кювете при длине волны возбуждения и измеряемой люминесценции соответственно.

Уравнение (2.15) позволяет оценить эффект реабсорбции в двух крайних ситуациях, действительно встречающихся в практике спектрофлуориметрии.

Случай 1. Сильно разбавленные растворы ( $D_b + D_n < 0,1$ ). При этом получаем приближенное значение  $I_n(0)$  [(ср. уравнения (2.3) и (2.4)], равное

$$I_n(0) \approx I_0 \cdot 2,3 K \phi D_b. \quad (2.16)$$

Уравнение (2.16) идентично уравнению (2.4). Реабсорбция не имеет места, так как  $I_n(0)$  не зависит от  $D_n$ .

Случай 2. Очень концентрированные растворы ( $D_b + D_n \gg 1$ ). В этом случае уравнение (2.15) приобретает вид

$$I_n(0) = I_0 K \phi \frac{D_b}{D_b + D_n}. \quad (2.17)$$

В этом случае реабсорбция зависит от соотношения оптических плотностей растворов в области возбуждения и люминесценции.

Влияние реабсорбции на спектр лучше всего выразить через отношение интенсивности люминесценции в отсутствие реабсорбции (т. е. при  $D_n=0$ ) к люминесценции при ее наличии. Это соотношение ( $\alpha$ ) можно получить из уравнения (2.17)

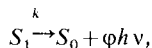
$$\alpha = 1 + \frac{D_n}{D_b}. \quad (2.18)$$

Анализ выражения (2.18) показывает, что реабсорбция тем ниже, чем выше  $D_b$ . Следовательно, для уменьшения реабсорбции надо осуществлять возбуждение в максимуме поглощения вещества. Далее понятно, что реабсорбция будет максимальной в области перекрытия спектров люминесценции и поглощения, т. е. в коротковолновой части спектра люминесценции, где велика  $D_n$ .

Таким образом, для уменьшения реабсорбции следует: 1) использовать образцы с низкой оптической плотностью; 2) измерение люминесценции осуществлять с передней стенки; 3) возбуждать люминесценцию в максимуме поглощения вещества.

## 2.10. Время жизни возбужденного состояния молекул

Важная характеристика люминесценции — скорость ее затухания после прекращения возбуждения, которая зависит от времени жизни молекул в возбужденном состоянии  $\tau$ . Для изучения кинетики затухания люминесценции можно измерять интенсивность люминесценции  $I_n$  как функцию времени  $t$  после мощного импульсного освещения объекта в момент  $t=0$ . (Наиболее мощные и короткие импульсы дают лазеры.) Сразу после действия импульса какое-то количество молекул окажется в возбужденном состоянии  $S_1$ , из которого они начнут переходить в основное состояние  $S_0$  с испусканием фотона



где  $\phi$  — квантовый выход люминесценции.

Процесс имеет вероятностный характер и  $k$  означает вероятность  $S_1 \rightarrow S_0$  перехода в единицу времени. Кинетика перехода аналогична кинетике химической реакции первого порядка, т. е.

$$\frac{d[S_1]}{dt} = -k[S_1], \quad (2.19)$$

где  $[S_1]$  — количество возбужденных молекул в образце.

Заметим, что интенсивность люминесценции  $I_n$  тоже зависит от времени:

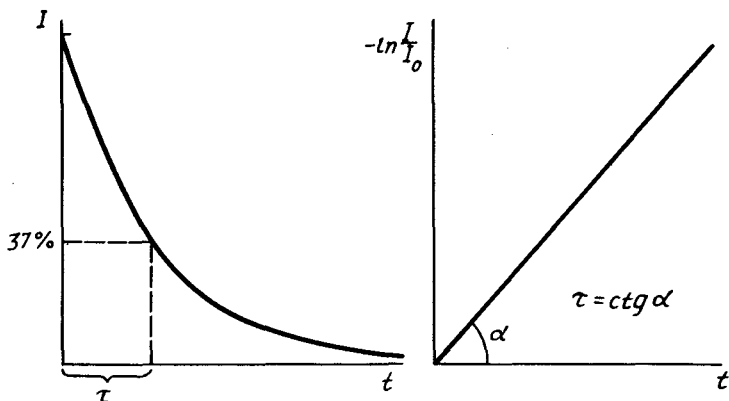


Рис. 2.13. Нахождение времени жизни ( $\tau$ ) флуоресценции

$$I_n = \frac{d[h\nu]}{dt} = -k[S_1].$$

Величина  $k$  имеет размерность частоты ( $\text{с}^{-1}$ ), а обратная ей величина  $\tau$  имеет размерность времени и называется средним временем жизни молекул в возбужденном состоянии:

$$\tau = 1/k. \quad (2.20)$$

Из уравнений (2.19) и (2.20) следует, что

$$\ln \frac{[S_1]_0}{[S_1]_t} = kt = \frac{t}{\tau} \quad \text{и} \quad \ln \frac{I_{n,0}}{I_{n,t}} = \frac{t}{\tau}, \quad (2.21)$$

где  $[S_1]_0$  и  $[S_1]_t$  — количество возбужденных молекул в начальный момент времени и в момент времени  $t$ ;  $I_{n,0}$  и  $I_{n,t}$  — интенсивность люминесценции в нулевое время и через время  $t$ .

Таким образом, свечение затухает по экспоненциальному закону. Построив график  $\ln(I/I_0) = f(t)$ , находим  $\tau$  (рис. 2.13). Можно определить  $\tau$  и непосредственно на кривой затухания.

Несмотря на кажущуюся простоту описанного метода, непосредственно его реализовать трудно, так как времена затухания люминесценции очень малы и регистрировать кривую затухания люминесценции без искажений нелегко. Поэтому в настоящее время получили распространение методы более сложные в теории, но экспериментально выполнимые: метод однофотонной  $\tau$ -метрии и метод фазовой  $\tau$ -метрии.

При методе однофотонной фотометрии возбуждение образца также проводится короткой ( $0,1$ — $10$  нс) вспышкой света. В момент окончания вспышки  $t=0$  какая-то часть молекул в образце окажется в возбужденном состоянии. Каждая молекула, поглотившая фотон, высветит его через время  $\tau_i$ , т. е.  $\tau_i$  — время жизни воз-

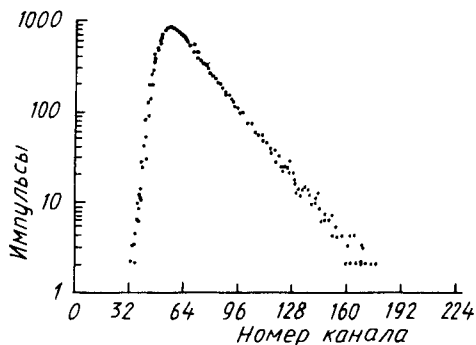


Рис. 2.14. Затухание флуоресценции 8-метоксиборалена в этаноле, измеренное методом однофотонной фотометрии

В однофотонном  $\tau$ -метре существует компьютерное устройство, позволяющее находить гистограмму распределения импульсов по  $\tau_i$ . Экспериментатор задает две величины: общее время счета импульсов  $T$  (время практически полного затухания свечения) и число интервалов  $n$ , равных длительности  $\Delta t = T/n$ . Число импульсов  $\Delta x(i)$  в каждом  $i$ -м интервале времени запоминается в ячейках памяти многоканального анализатора;  $i$  называют номером канала. Вывод полученных данных на график можно осуществлять в нескольких вариантах.

1. Непосредственно построить гистограмму распределения импульсов по каналам, т. е. функцию  $\Delta x(i) = f(i)$  (рис. 2.14).

2. Построить гистограмму распределения импульсов по  $t$ . Для этого находят для каждого канала время  $t = \Delta t i$  и строят зависимость  $\Delta x(t) \equiv \Delta x(i) = f(t) \equiv f(\tau_i)$ .

3. Построить кривую затухания люминесценции. Интенсивность люминесценции в каждый момент времени равна скорости счета импульсов, т. е.

$$I_n(t) = \frac{dx}{dt} \approx \frac{\Delta x(t)}{\Delta t} = f(t). \quad (2.22)$$

Заметим, что все полученные кривые по форме будут одинаковы, так как аргументы  $i$  и  $t$  пропорциональны друг другу, как и функции  $\Delta x$  и  $I_n$ . Характер зависимости  $I_n$  от времени может быть найден из уравнения (2.21):

$$I_n(t) = I_n(0) e^{-t/\tau}. \quad (2.23)$$

Из уравнений (2.22) и (2.23) следует, что

$$\Delta x(t) = \Delta x(0) e^{-t/\tau}. \quad (2.24)$$

бужденного состояния данной молекулы. Определенная доля таких фотонов регистрируется ФЭУ и усилительной системой в виде импульсов фототока. Пренебрегая задержками в системе ФЭУ — усилитель, можно считать, что  $\tau_i$  равно времени между окончанием возбуждающей вспышки и импульсом. Поскольку молекул в образце много, то и импульсов флуоресценции будет много, каждый характеризуется своим  $\tau_i$ .



Имея кривую распределения импульсов по  $\tau_i$  (или, что то же самое, кривую затухания люминесценции), можно найти величину среднего времени жизни молекул в возбужденном состоянии  $\tau$  одним из трех способов: по начальному наклону кривой, по времени снижения скорости счета в  $e$  раз (т. е. до 0,37 от первоначального значения) или по углу наклона полулогарифмической анаморфозы.

Рассмотрим первый способ. Для этого проинтегрируем функцию из уравнения (2.23) в интервале времени от 0 до  $\infty$  и получим светосумму люминесценции (в данном случае это соответствует общему числу импульсов за большое время  $T$ )

$$S = \int_0^{\infty} I_n(t) dt = I_n(0) \tau.$$

В приборе эта операция осуществляется путем суммирования импульсов по всем каналам:

$$S = \sum_i \Delta x_i.$$

Разделив  $S$  на начальную скорость счета импульсов, получаем  $\tau$ :

$$\tau = S / I_n(0) = S \Delta t / \Delta x(0).$$

Второй метод станет понятным, если найти скорость счета через время  $\tau$  (2.23):

$$I_n(\tau) = I_n(0) / e.$$

Отложив на ординате графика затухания люминесценции величину, равную  $1/e$  от начальной скорости счета импульсов [или  $\Delta x(0)$ ], проводим прямую, параллельную оси абсцисс до пересечения с кривой затухания. Время, соответствующее точке пересечения, и есть  $\tau$ , т. е. среднее время жизни возбужденного состояния молекул.

Наилучшим следует признать все же третий метод, так как в нем используются все полученные в опыте значения скорости счета в каждый момент времени. Строится зависимость  $\ln I_n = f(t)$  или  $\ln(\Delta x) = f(t)$ . Логарифмирование уравнений (2.23) и (2.24) показывает, что полученные графики представляют собой прямые линии, угол наклона которых к оси абсцисс дает величину  $1/\tau$ :

$$\ln I_n(t) = \ln I_n(0) - t/\tau.$$

$$\ln[\Delta x(t)] = \ln[\Delta x(0)] - t/\tau.$$

Часто встречаются случаи, когда в исследуемой системе содержится несколько типов флуоресцирующих молекул, характеризующихся разными значениями  $\tau$ . Тогда кривая затухания люминесценции будет представлять сумму нескольких экспонент:

$$\ln I_n(t) = \ln I_n(0) - \sum_j (t/\tau_j).$$

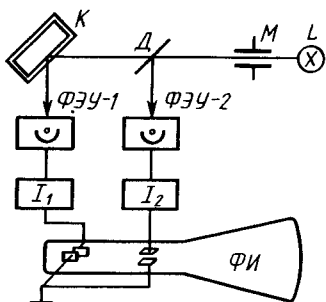


Рис. 2.15. Фазовый флуориметр

Для нахождения каждого значения  $\tau$ , необходимо суммарную кривую разложить на индивидуальные экспоненты. Рассмотрим кратко принцип метода фазовой флуориметрии. Схема фазового флуориметра приведена на рис. 2.15. Возбуждающий пучок света пропускается через модулирующее устройство  $M$ , воздействующее на пучок так, что его мощность после прохождения модулятора меняется с частотой 10—20 МГц. Эти изменения мощности происходят по простому синусоидальному закону  $I = I_0(1 + m \cos \omega t)$ , где  $\omega$  — круговая частота модуляции, имеющая значение около  $10^8$  Гц;  $m$  — коэффициент глубины модуляции (отношение амплитуды переменной составляющей потока к постоянной составляющей).

Этот модулированный поток света делится прозрачной пластинкой  $D$  на две части: одна (около 8%) отражается от пластинки и действует на  $\PhiЭУ-2$ , в котором возникает ток, меняющийся по описанному закону. Другая, большая часть света, возбуждает флуоресценцию в кювете  $K$ , и свет флуоресценции попадает на другой приемник —  $\PhiЭУ-1$ . Свет флуоресценции также будет промодулирован с частотой  $\omega$ , но так как он задерживается в образце на среднее время жизни  $\tau$ , то фаза модуляции света флуоресценции будет отставать от фазы возбуждающего света на некоторый угол  $\varphi$ . Расчет показывает, что при этом и глубина модуляции несколько меняется для флуоресценции. Таким образом, закон изменения света на приемнике  $\PhiЭУ-1$  имеет вид  $\bar{f} = \bar{f}_0 [1 + m\alpha \cos(\omega t - \varphi)]$ , где  $\alpha < 1$ . При экспоненциальном законе затухания флуоресценции связь между сдвигом фазы  $\varphi$ , множителем  $\alpha$  и величиной  $\tau$  проста:

$$\operatorname{tg} \varphi = \omega \tau; \quad \alpha = \cos \varphi,$$

т.е. для измерения  $\tau$  достаточно измерить сдвиг фазы между токами, возникающими в приемниках  $\PhiЭУ-1$  и  $\PhiЭУ-2$ . Это осуществляется при помощи фазоизмерительных устройств  $\PhiИ$ .

### 2.11. Связь квантового выхода со временем жизни возбужденного состояния молекул

Между временем жизни молекул в возбужденном состоянии и квантовым выходом люминесценции существует прямая пропорциональная зависимость, причина которой выясняется при рассмотрении вероятности излучательных и безызлучательных переходов в возбужденных молекулах. На рис. 2.16 вертикальные стрелки показывают направление электронных переходов в воз-

бужденной молекуле, а величины  $k_1$ ,  $k_2$  и  $k_3$  — константы скоростей соответствующих переходов. Переход 1 сопровождается испусканием фотона (люминесценцией), переходы 2 и 3 — безызлучательные. Переход 2 связан с внутренними свойствами самой люминесцирующей молекулы, он осуществляется непосредственно или через триплетное состояние. Переход 3 имеет место при взаимодействии возбужденной молекулы с посторонней молекулой тушителя люминесценции. Время жизни возбужденного состояния молекул уменьшается с увеличением общей вероятности всех переходов  $S_1 \rightarrow S_0$ . Квантовый выход зависит от соотношения вероятностей излучательного и безызлучательных переходов.

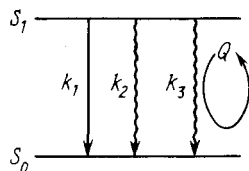
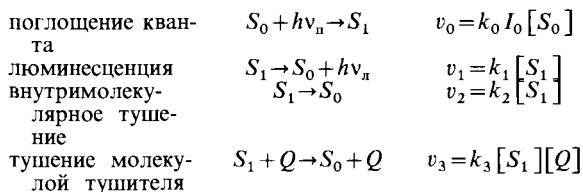


Рис. 2.16. Дезактивация возбужденной молекулы в присутствии тушителя

Для количественного описания процессов представим поглощение, люминесценцию и безызлучательные переходы в форме уравнений химических реакций:



Так как при непрерывном освещении система находится в стационарном состоянии, общее число переходов из возбужденного состояния в основное в единицу времени ( $v_1 + v_2 + v_3$ ) равно числу квантов света ( $v_0$ ), поглощенных за это время. Число излучательных переходов  $v_1$  равно числу высвеченных фотонов люминесценции. Отношение  $v_1$  к  $v_0$  или к  $(v_1 + v_2 + v_3)$  есть, по определению, квантовый выход люминесценции  $\varphi$ :

$$\varphi = \frac{\text{число квантов люминесценции}}{\text{число поглощенных квантов}} = \frac{k_1}{k_1 + k_2 + k_3 [Q]} \quad (2.25)$$

В отсутствие тушителя  $Q$  квантовый выход флуоресценции будет выше:

$$\varphi = \frac{k_1}{k_1 + k_2} \quad (2.26)$$

Степень тушения флуоресценции тушителем может быть выражена уравнением Штерна — Фольмера

$$\frac{\varphi}{\varphi_0} = 1 + \frac{k_3}{k_1 + k_2} [Q] = 1 + K [Q] \quad (2.27)$$

Поскольку при тушении люминесценции по описанному механизму изменения поглощения флуоресцирующего вещества в присутствии тушителя не происходит, уравнение (2.27) можно записать и в виде

$$\frac{I}{I_q} = 1 + K[Q], \quad (2.28)$$

где  $I$  и  $I_q$  — интенсивности флуоресценции при одном и том же способе возбуждения растворов в отсутствие и в присутствии тушителя.

Уравнение (2.28) обычно используют в экспериментальной работе. Уравнение Штерна — Фольмера предполагает прямую пропорциональность между  $I/I_q$  и концентрацией тушителя  $Q$ , наклон прямой на графике позволяет найти константу  $K$ , которая может служить мерой эффективности тушителя.

Перейдем к рассмотрению времени жизни возбужденного состояния. Как уже говорилось, среднее время жизни возбужденного состояния молекулы есть величина, обратная константе перехода из возбужденного состояния в основное. При полном отсутствии безызлучательных переходов скорость процесса  $S_1 \rightarrow S_0$  определяется только константой скорости излучательного перехода  $k_1$ . Обратная ей величина  $\tau_0$  может быть названа *излучательным временем* жизни молекул в возбужденном состоянии:

$$\tau_0 = 1/k_1. \quad (2.29)$$

Такое время жизни наблюдалось бы в отсутствие каких бы то ни было процессов тушения флуоресценции, т.е. при квантовом выходе флуоресценции, равном единице.

В реальных условиях из-за процессов тушения скорости безызлучательных переходов отнюдь не равны нулю, и суммарная константа первого порядка перехода  $S_1 \rightarrow S_0$  равна  $(k_1 + k_2 + k_3 [Q])$ . Обратная ей величина представляет собой среднее время жизни молекул в возбужденном состоянии:

$$\tau_q = 1/(k_1 + k_2 + k_3 [Q]). \quad (2.30)$$

Из уравнения (2.29) следует, что тушитель, ускоряя переход  $S_1 \rightarrow S_0$ , уменьшает  $\tau$ . В отсутствие тушителя

$$\tau = 1/(k_1 + k_2). \quad (2.31)$$

Сокращение времени жизни возбужденного состояния в присутствии тушителя описывается уравнением, аналогичным (2.28):

$$\tau/\tau_q = 1 + k_3 \tau [Q] = 1 + K[Q]. \quad (2.32)$$

Из уравнений (2.30) и (2.29) находим, что отношение  $\tau_q/\tau_0$  равно величине  $\phi_q$  [сравни уравнение (2.41)]. Точно так же можно найти из уравнений (2.26), (2.31) и (2.29), что  $\tau/\tau_0 = \phi$ . Таким

образом, независимо от наличия тушителей люминесценции реальное время жизни молекул данного вида  $\tau$  пропорционально квантовому выходу флуоресценции:

$$\tau/\tau_0 = \varphi. \quad (2.33)$$

Таким образом,  $\tau_0$  является теоретическим пределом длительности жизни возбужденного состояния молекул данного вещества, так как максимально  $\varphi=1$ . Поскольку  $1/\tau_0 = k_1$  связана с вероятностью перехода молекулы в возбужденное состояние за счет поглощения фотона  $k_0$  и, отсюда, с коэффициентом поглощения  $\varepsilon$ ,

$$k_1 = \frac{1}{\tau_0} = \frac{\bar{\nu}_m^2}{3,5 \cdot 10^8} \int_{\bar{\nu}=0}^{\infty} \varepsilon d\bar{\nu}, \quad (2.34)$$

где  $\bar{\nu}$  — волновое число, обратное длине волны поглощаемого излучения;  $\bar{\nu}_m = \bar{\nu}$  в максимуме поглощения; а интеграл равен площади спектра поглощения и соответствует  $\approx \varepsilon_m \Delta\bar{\nu}_{1/2}$  (здесь  $\varepsilon_m$  — коэффициент поглощения в максимуме, а  $\Delta\bar{\nu}_{1/2}$  — полуширина полосы поглощения).

Из уравнения (2.34) следует, что чем интенсивнее полоса поглощения вещества, тем меньше время жизни молекул в возбужденном состоянии и наоборот. В случае сильно поглощающих соединений с  $\varepsilon_m$  порядка  $10^5$  л·моль<sup>-1</sup>·см<sup>-1</sup>  $\tau_0$  имеет порядок величины  $10^{-8}$  —  $10^{-9}$  с.

## 2.12. Статическое и динамическое тушение флуоресценции

Всякое снижение квантового выхода флуоресценции может рассматриваться как процесс тушения флуоресценции. Основная причина тушения флуоресценции — взаимодействие молекул флуоресцирующего соединения с другими молекулами в среде, которые можно назвать в общем случае молекулами тушителя. Действие большинства молекул-тушителей основано на возмущении электронных уровней в люминесцирующей молекуле, изменении расстояний между уровнями, увеличении вероятности безызлучательных переходов, в частности в увеличении вероятности  $S_1 \rightarrow T_1$  перехода, который при комнатной температуре сопровождается практически полной тепловой диссипацией энергии возбужденного состояния.

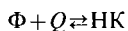
К числу наиболее активных тушителей флуоресценции относятся: 1) тяжелые анионы и катионы  $I^-$ ,  $Br^-$ ,  $Cs^+$ ,  $Cu^{2+}$  (при этом облегчается  $S_1 \rightarrow T_1$  переход); 2) парамагнитные ионы и молекулы  $O_2$ ,  $Mn^{2+}$ , нитроксильные радикалы; 3) молекулы растворителя. Наибольшим тушащим действием обладают обычно полярные растворители, такие, как вода; тушение, по-видимому, связано с

облегчением  $S_1 \rightarrow T_1$  перехода в молекуле флуоресцирующего соединения; 4) акцепторы электронной энергии возбуждения (см. гл. 3).

Следует отметить, что тушащее действие молекул растворителя трудно оценить количественно. Так как люминесценция биологически важных веществ всегда измеряется в том или ином растворителе, можно лишь сравнивать квантовые выходы флуоресценции вещества в разных растворителях. Поскольку концентрация растворителя постоянна, на схеме рис. 2.16 и в уравнениях, рассмотренных в предыдущих разделах, тушение растворителем входит в величину константы  $k_2$ . Тушителями в более узком смысле называют поэтому обычно не растворитель, а растворенные в нем молекулы других соединений, с увеличением концентрации которых квантовый выход снижается. Константа обычно достаточно велика, и поэтому квантовый выход флуоресценции подавляющего большинства окрашенных органических соединений в отсутствие посторонних тушителей составляет доли процента. Такие вещества считаются нелюминесцирующими. Флуоресцирующими можно считать соединения с квантовым выходом флуоресценции выше 0,01. Флуоресцентные красители имеют квантовые выходы, измеряемые процентами и даже десятками процентов. Увеличение температуры, как правило, резко снижает квантовый выход и, следовательно, интенсивность люминесценции (температурное тушение люминесценции).

Согласно С. И. Вавилову, тушение флуоресценции молекулами-тушителями может быть статическим (тушение I рода) и динамическим (тушение II рода). Особенностью динамического тушения является параллельное снижение  $\phi$  и  $\tau$  по мере увеличения концентрации тушителя (2.28), (2.32) и (2.33).

Статическое тушение связано с образованием нефлуоресцирующих комплексов НК флуоресцирующих молекул  $\Phi$  с молекулами тушителя  $Q$ :



Отношение концентраций свободного и связанного флуоресцирующего вещества  $[\Phi]/[\text{НК}]$  может быть найдено из уравнения равновесия

$$K_d = \frac{[\Phi][Q]}{[\text{НК}]}, \quad (2.35)$$

где  $K_d$  — константа диссоциации комплекса.

Если поглощение вещества  $\Phi$  и комплекса не различаются, то

$$\frac{\phi}{\phi_0} = \frac{[\text{НК}] + [\Phi]}{[\Phi]} = 1 + \frac{[\text{НК}]}{[\Phi]}.$$

Используя (2.35), получаем уравнение

$$\frac{\Phi}{\Phi_q} = 1 + \frac{1}{K_d} [Q], \quad (2.36)$$

аналогичное уравнению Штерна—Фольмера (2.27).

Если поглощение комплекса отлично от поглощения флуоресцирующего вещества, то уравнение (2.36) не соблюдается. Однако при низких оптических плотностях растворов будет справедливо отношение

$$\frac{I}{I_q} = \frac{[НК] + [\Phi]}{[\Phi]},$$

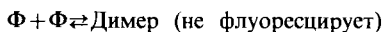
где  $I_q$  и  $I$ —интенсивности люминесценции в присутствии и отсутствие тушителей. После преобразований, аналогичных сделанным выше, находим

$$\frac{I}{I_q} = 1 + \frac{1}{K_d} [Q]. \quad (2.37)$$

Это уравнение очень похоже на уравнение (2.28).

Таким образом, по характеру зависимости интенсивности флуоресценции от концентрации тушителя статическое и динамическое тушение неразличимо. Но при статическом тушении не происходит сокращения времени жизни возбужденного состояния; уменьшается лишь доля молекул, обладающих флуоресценцией, но все ее характеристики (кроме квантового выхода) не изменяются.

Частным случаем статического тушения является так называемое концентрационное тушение, которое связано с образованием нефлуоресцирующих димеров и более крупных агрегатов молекул при высокой концентрации флуоресцирующего вещества:



Явление концентрационного тушения широко распространено и в ряде случаев находит полезное применение. Так, например, можно наблюдать за накоплением клетками или митохондриями некоторых флуоресцирующих красителей по эффекту тушения флуоресценции. По мере накопления вещества его концентрация в окружающей среде падает. Внутри клеток или органелл концентрация красителя оказывается весьма высокой и образуются нефлуоресцирующие комплексы. К этому иногда добавляется тушение за счет комплексообразования с внутриклеточными соединениями, например гемопротеидами. К числу красителей, накопление которых клетками сопровождается тушением, принадлежит 9-аминоакридин. Это соединение интересно тем, что накапливается в клетках, хлоропластах и митохондриях, если в них происходит снижение рН. Таким образом, удастся измерять внутриклеточный или внутримитохондриальный рН по степени тушения флуоресценции аминокридина, добавленного к суспензии.

Если некоторые акридиновые красители могут служить флуоресцентным зондом на рН, то цианиновые красители с успехом применяются для измерения трансмембранного потенциала в суспензиях клеток, митохондрий, хлоропластов. Например, зонд  $\text{dis-C}_3(5)$ , молекулы которого несут положительные заряды, накапливается в митохондриях при их энергизации, когда на мембране создается разность потенциалов со знаком минус внутри. Чем выше отрицательный потенциал, тем большая часть зонда переносится в митохондрии. Вследствие концентрационного тушения зонда внутри органелл, наблюдается тушение флуоресценции зонда в суспензии. Таким образом, краситель  $\text{dis-C}_3(5)$  используется в качестве флуоресцентного зонда на мембранный потенциал.

### 2.13. Флуоресценция димеров и эксимеров

Как статическое, так и динамическое взаимодействие молекул может приводить к образованию комплексов, обладающих флуоресценцией, но в иной области спектра по сравнению с молекулами неассоциированного флуоресцирующего вещества. В качестве примера образования флуоресцирующих комплексов при увеличении концентрации растворов можно привести краситель акридиновый оранжевый: в разбавленных растворах флуоресцирует мономерная форма красителя с максимумом флуоресценции при 530 нм, в концентрированных растворах флуоресцирует димер красителя с максимумом при 640 нм.

Особый интерес представляет образование возбужденных димеров флуоресцирующих молекул (эксимеров) при кинетическом столкновении возбужденной молекулы с невозбужденной:

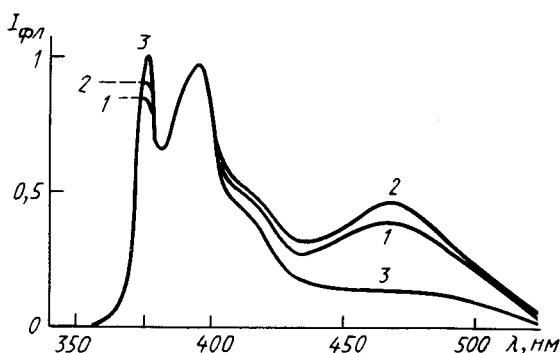
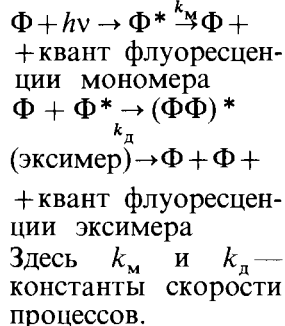


Рис. 2.17. Спектры флуоресценции пирена (5 мкМ) в суспензии саркоплазматического ретикулума (0,1 мг белка/мл) при возбуждении 286 нм (1) и 334 нм (2) и пирена в растворе, содержащем 1 мг/мл бычьего сывороточного альбумина при возбуждении 286 нм



Примером соединения, образующего эксимеры, может служить пирен (рис. 2.17). В разбавленных или вязких ра-



створах флуоресцирует мономерная форма зонда; имеется два основных максимума флуоресценции — при 372 и 394 нм. В более концентрированных, но невязких растворах появляется новая широкая полоса флуоресценции эксимеров с максимумом при 470 нм. Отношение интенсивностей флуоресценции в максимуме флуоресценции эксимерной и мономерной форм  $K_3 = I_{470}/I_{400}$  получило название *коэффициента эксимеризации*, который возрастает с увеличением концентрации пирена и уменьшением вязкости среды. Запишем скорости процессов 1 и 2 (флуоресценции мономера и эксимера) в стационарных условиях:

$$v_m = k_m [\Phi^*]; \quad v_d = k_d [\Phi] [\Phi^*]. \quad (2.38)$$

Коэффициент эксимеризации пропорционален отношению скоростей этих процессов:

$$K_3 = A \frac{v_d}{v_m} = A \frac{k_d}{k_m} [\Phi], \quad (2.39)$$

где  $A$  — коэффициент пропорциональности, зависящий от формы спектров и относительных квантовых выходов флуоресценции мономера и эксимера.

Константа скорости мономолекулярной реакции  $k_m$  от вязкости среды не зависит. Константа скорости бимолекулярной реакции  $k_d$  находится в обратной зависимости от вязкости среды: с ростом вязкости уменьшается скорость движения молекул и, следовательно, путь, который успевает пройти возбужденная молекула за время жизни возбужденного состояния  $\tau$ . Поэтому можно записать  $k_d = B/\eta$ , где  $\eta$  — вязкость, а  $B$  коэффициент пропорциональности, включающий в себя тепловую энергию молекул (т.е.  $kT$ ). Подставив  $k_d$  в уравнение (2.39), получаем

$$K_3 = C[\Phi]\tau_m/\eta, \quad (2.40)$$

где  $\tau_m = 1/k_m$  — время жизни возбужденного состояния мономера пирена в отсутствие эксимеризации;  $C = AB$  — объединенная константа.

Из выражения (2.40) следует, что коэффициент эксимеризации прямо пропорционален концентрации пирена и обратно пропорционален вязкости окружающей среды. На этом основано использование зонда — пирена для изучения изменения микровязкости липидного слоя биологических мембран и липидной фазы липопротеидов. Например, сравнение эксимеризации пирена, добавленного к липопротеидам низкой плотности, выделенных из плазмы крови здоровых пациентов и больных ишемической болезнью сердца, показывает, что при равных концентрациях зонда эксимеризация ниже в липопротеидах больных, что связано с более высоким содержанием холестерина и более высокой вязкостью липидной фазы липопротеидов в этом случае.

## 2.14. Поляризация люминесценции

Молекулы поглощают преимущественно то излучение, электрический вектор в котором направлен параллельно моменту перехода электрона в молекуле. В растворах молекулы, а следовательно, и векторы их переходов ориентированы случайным образом. При освещении раствора плоскополяризованным светом селективно возбуждаются те молекулы, в которых момент перехода при поглощении окажется параллельным электрическому вектору возбуждающего света, т.е. лежит в плоскости поляризации и расположен нормально (перпендикулярно) к направлению светового потока. Такое селективное возбуждение определенным образом ориентированных молекул приводит к тому, что свет флуоресценции будет частично поляризованным. Из сказанного ясно, что степень поляризации флуоресценции будет максимальной при следующих условиях: 1) раствор освещают плоскополяризованным светом; 2) вектор перехода при излучении параллелен вектору перехода при поглощении (угол между векторами переходов  $\beta = 0$ ); 3) за время жизни возбужденного состояния молекула не успевает изменить своей ориентации.

Для количественной оценки явления поляризации флуоресценции используют две взаимосвязанные характеристики: степень (коэффициент) поляризации люминесценции  $P$  и анизотропию люминесценции  $A$ . Измерение степени поляризации флуоресценции осуществляют на приборе, принципиальная схема которого дана на рис. 2.18. Положение кюветы примем в качестве начала координат. Возбуждающее излучение, направление которого примем за ось  $x$ , проходит через поляризатор, установленный обычно таким образом, чтобы плоскость поляризации была вертикальной (электрический вектор излучения параллелен оси  $z$ ). В направлении горизонтальной оси  $y$  устанавливают приемник света, перед которым

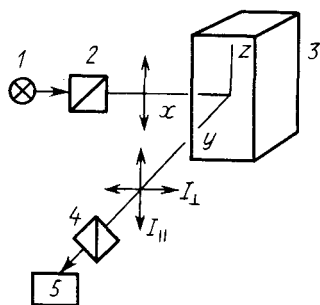


Рис. 2.18. Схема регистрации поляризации флуоресценции:

1 — источник света; 2 — поляризатор; 3 — образец; 4 — анализатор; 5 — детектор

помещают вращающийся поляризатор, называемый анализатором. Электрический вектор света, пропускаемого анализатором, может быть параллелен оси  $z$  или перпендикулярен ей (параллелен оси  $x$ ). Интенсивность флуоресценции, измеряемой в этих двух положениях анализатора, обозначим как  $I_{||}$  и  $I_{\perp}$  соответственно.

Свет флуоресценции, измеряемый установкой, можно рассматривать как смесь плоскополяризованного излучения  $I_{||}$  и неполяризованного излучения  $I_{\perp}$ . Количественной характеристикой степени поляризации считают отношение  $P = I_{||} / (I_{||} + I_{\perp})$ , которое можно

выразить через экспериментально определяемые величины  $I_{\parallel}$  и  $I_{\perp}$ . Из оптики известно, что поляризатор с идеальным пропусканием уменьшает интенсивность неполяризованного света вдвое, и пропускает весь плоскополяризованный свет, если векторы поляризации света и поляроида совпадают, и не пропускает света, если эти векторы перпендикулярны. Тогда ясно, что

$$I_{\parallel} = I_{\parallel} + I_{\perp}/2; \quad I_{\perp} = I_{\parallel}/2. \quad (2.41)$$

Подставив полученные  $I_{\parallel}$  и  $I_{\perp}$  в уравнение для  $P$ , получаем выражение для коэффициента поляризации

$$P = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}}. \quad (2.42)$$

Выражение в знаменателе (2.42) равно общей интенсивности света флуоресценции, измеряемой детектором. Вклад вектора, направленного вдоль оси  $y$ , принимается равным нулю, так как световые волны, распространяющиеся вдоль оси  $y$ , этого вектора не содержат. Но в излучении самого образца этот вектор присутствует. В связи с этим для характеристики люминесценции используют анизотропию  $A$ , в знаменатель которой входят составляющие всех трех векторов электрического поля излучения  $I_z + I_x + I_y = I_{\parallel} + I_{\perp}$ . Итак, анизотропия флуоресценции равна

$$A = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}}. \quad (2.43)$$

Нетрудно вывести уравнения, связывающие  $P$  и  $A$ . Зная одну из этих величин, легко найти другую.

Величина поляризации флуоресценции зависит от угла  $\beta$  между векторами электронных переходов в молекуле при поглощении и испускании и от вязкости среды в непосредственном окружении флуоресцирующих молекул  $\eta$ .

Рассмотрим сначала влияние угла  $\beta$  между осцилляторами. Для этого необходимо изучать поляризацию флуоресценции в очень вязких растворителях ( $P_0$ ), с тем чтобы направление векторов электронных переходов не успевали заметно измениться за время жизни возбужденного состояния молекул. В этом случае связь между  $\beta$  и  $P_0$  описывают уравнением Перрена — Яблонского

$$P_0 = (3\cos^2 \beta - 1)/(\cos^2 \beta + 3). \quad (2.44)$$

Зная  $P_0$ , можно найти угол  $\beta$ . Уравнение (2.44) выведено для случая возбуждения флуоресценции плоскополяризованным светом, как это изображено на рис. 2.18. Интересно, что при измерении под прямым углом флуоресценция будет частично поляризована даже при возбуждении неполяризованным излучением. Это связано с тем, что вследствие поперечных колебаний световых волн при освещении даже неполяризованным светом

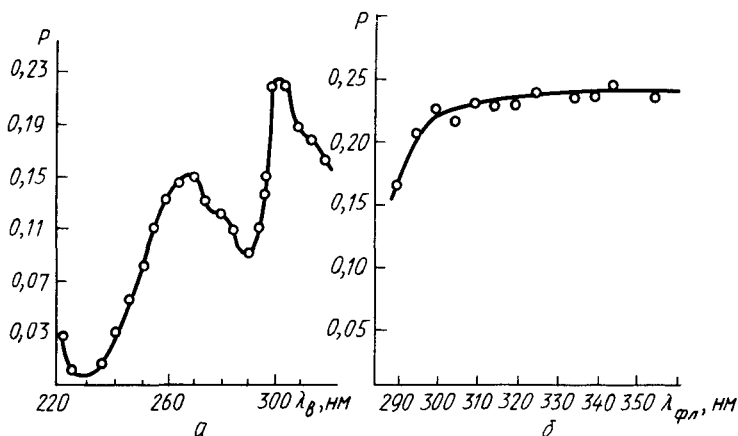


Рис. 2.19. Спектры поляризации флуоресценции триптофана по возбуждению (а) и по испусканию (б)

возбуждаются молекулы с вектором осциллятора поглощения, лежащим в плоскости  $zoy$ , и не возбуждаются, если направление этого вектора совпадает с осью  $x$ . Если возбуждающий свет неполяризован, то

$$P_0 = (3\cos^2 \beta - 1) / (7 - \cos^2 \beta).$$

При изменении угла  $\beta$  от  $0$  до  $90^\circ$  предельная поляризация меняется в следующих пределах: от  $+1/2$  до  $-1/3$ , если возбуждающий свет поляризован; от  $+1/3$  до  $-1/7$ , если возбуждающий свет неполяризован.

Все сказанное выше относилось к возбуждению и измерению флуоресценции при некоторых фиксированных длинах волн  $\lambda_{в}$  и  $\lambda_{фл}$ . Используя монохроматоры на возбуждении и регистрации флуоресценции, можно измерять два спектра поляризации флуоресценции: по излучению  $P_0 = f(\lambda_{фл})$ ; по возбуждению  $P_0 = f(\lambda_{в})$ .

Поскольку испускание кванта флуоресценции происходит всегда с одного и того же электронного уровня, угол  $\beta$ , а значит, и  $P_0$  не зависят от длины волны регистрируемой люминесценции. Иными словами, для гомогенного раствора одного вещества спектр поляризации флуоресценции по испусканию представляет собой прямую линию, параллельную оси длин волн. Приблизительно такой вид имеет спектр поляризации флуоресценции триптофана (рис. 2.19, б). Иное дело спектр поляризации флуоресценции по возбуждению. Спектр поляризации флуоресценции по возбуждению для триптофана приведен на рис. 2.19, а. Для интерпретации этого спектра следует вспомнить, что триптофан имеет три максимума в спектре поглощения: 220, 280 и 296 нм, последний выражен в виде небольшого плеча на длинноволновом склоне кривой поглощения. Эти максимумы можно наблюдать и

на спектрах возбуждения флуоресценции триптофана и белков (см. рис. 2.10). Основной вклад в положительную поляризацию флуоресценции дает, по-видимому, максимум при 296 нм. Очевидно, что вектор электронного перехода в данной полосе лежит приблизительно параллельно вектору перехода при испускании квантов флуоресценции. На эту полосу накладываются две полосы с отрицательной поляризацией с максимумами 280 и 220 нм. Векторы электронных переходов при поглощении в этих полосах направлены нормально к вектору перехода при испускании. Суперпозиция этих полос и приводит к сложному спектру в области 220—320 нм возбуждения.

Точность определения углов  $\beta$  в подобных опытах невелика, но удается выяснить, сколько отдельных электронных переходов отражено в спектре поглощения и какова их примерная ориентация к переходу при излучении.

Проведенные расчеты относятся к совершенно неподвижным молекулам. При изучении растворов флуоресцирующих веществ коэффициент поляризации флуоресценции обычно снижен из-за вращательной диффузии молекул, которая характеризуется коэффициентом вращательной диффузии  $D_v$  или временем вращательной релаксации  $\rho$ :

$$D_v = RT/\xi, \quad \rho = 1/2D_v,$$

где  $R$ —газовая постоянная;  $T$ —абсолютная температура;  $\xi$ —коэффициент трения в среде.

Согласно Стоксу,  $\xi$  зависит от вязкости  $\eta$  и радиуса молекулы  $r$  (в случае сферических молекул):

$$\xi = 8\pi r^3 \eta = 6\eta V, \quad D_v = \frac{RT}{6\eta V},$$

где  $V$ —объем 1 моль молекул.

Часто вместо  $\rho$  используют время вращательной корреляции  $\sigma = \rho/3$ . В результате вращения молекул излучаемая флуоресценция деполаризуется, т. е. измеренные величины  $P$  будут меньше  $P_0$  (по модулю). Деполаризация флуоресценции ( $1/p$ ) зависит от среднего времени жизни возбужденного состояния молекул  $\tau$  и времени релаксации  $\rho$  (или вязкости  $\eta$ ) по уравнению Перрена-Яблонского

$$\frac{1}{P} \pm \frac{1}{3} = \left( \frac{1}{P_0} \pm \frac{1}{3} \right) \left( 1 + \frac{3\tau}{\rho} \right) = \left( \frac{1}{P_0} \pm \frac{1}{3} \right) \left( 1 + \frac{RT}{V\eta} \tau \right). \quad (2.45)$$

При возбуждении поляризованным светом в уравнении (2.45) надо пользоваться знаком минус, а при возбуждении неполяризованным светом—знаками плюс. Для анизотропии уравнение получается более простым по форме; в случае поляризованного возбуждения

$$\frac{1}{A} = \frac{1}{A_0} \left( 1 + \frac{RT}{V\eta} \tau \right), \quad \eta = \frac{A\tau RT}{(A_0 - A)V}. \quad (2.46)$$

Таким образом, для определения вязкости в непосредственном окружении люминесцирующей молекулы (микровязкость) необходимо измерить  $P$  и  $\tau$  и, кроме того, знать  $P_0$  (или измерить) для данной молекулы при тех же условиях измерения, что и  $P$ . Для несферических молекул получаются более сложные уравнения.

Уравнение (2.46) показывает, что область применения метода деполаризации флуоресценции зависит от размеров зонда, времени жизни  $\tau$  и вязкости среды. Флуоресценция большинства красителей в водных растворах полностью деполаризована, но становится заметной в случае флуоресцентных зондов, находящихся в более вязкой среде, например в липидном слое биологических мембран. Флуоресценция комплексов люминесцирующих веществ с белками заметно поляризована даже в водных растворах. Это и предопределило применение метода измерения деполаризации флуоресценции в биофизике. Был предложен метод изучения размеров (и отчасти — формы) белковых молекул путем измерения поляризации флуоресценции комплексов изучаемых белков с флуоресцирующими веществами. Г. Вебером были изучены комплексы, так называемые конъюгаты, белков с люминесцирующим производным нафталина — дансилхлоридом. Этот метод был использован также для изучения образования комплексов белков друг с другом, при этом размеры молекулы возрастали и поляризация флуоресценции усиливалась. При образовании в растворе комплексов белков с флуоресцирующими веществами, например некоторыми лекарствами, поляризация флуоресценции возрастает от нулевой до какой-то конечной величины. Поскольку метод измерения поляризации может быть малоинерционным, все рассмотренные процессы можно исследовать в кинетике.

Весьма широкое применение метода поляризации флуоресценции — использование специальных красителей (флуоресцентных зондов) для изучения вязкости биологических мембран в различных функциональных состояниях и при различных патологиях. Скорость вращения или поступательной диффузии зонда определяется микроструктурой его непосредственного окружения в мембране, поэтому вместо термина вязкость правильнее использовать микровязкость. Практически под этим понимается вязкость однородной среды, в которой зонд обладает той же вращательной подвижностью и поляризацией флуоресценции, если бы он был встроен в мембрану.

Использование этого метода позволило показать, что вязкость липидного слоя в мембранах лежит в пределах  $10^{-2}$  —  $10^{-3}$  Па · с и соответствует вязкости растительного масла. При функциональной активности клеток, а также при патологических состояниях микровязкость липидного слоя может существенно изменяться,

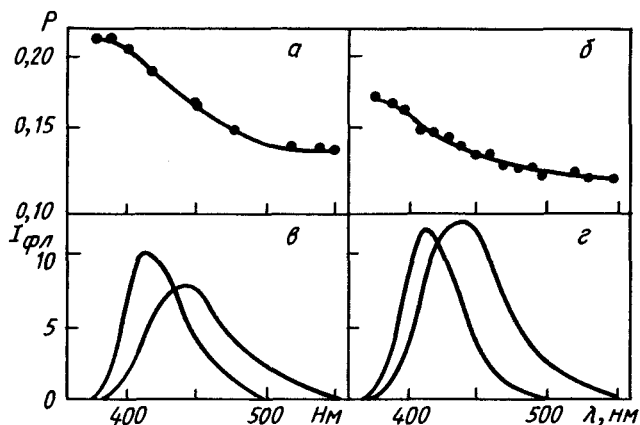


Рис. 2.20. Разложение на две компоненты флуоресценции зонда *N*-фенил-1-нафтиламина (4 мкМ) в липосомах из сфингомиелина (0,1 мг/мл) при 19° С (а, в) и 28° С (б, г). Разложение основано на анализе зависимости поляризации флуоресценции от длины волны испускания

что влияет на работу мембранных ферментов и рецепторов. Так, например, было обнаружено, что степень поляризации флуоресценции зонда 1,6-дифенил-1,3,5-гексатриена в лимфоидных клетках возрастает с увеличением отношения холестерин/липиды в них. Это имеет диагностическое значение, так как содержание холестерина в клетках падает при злокачественном перерождении и возрастает при атеросклерозе.

Интерпретация данных по поляризации флуоресценции существенно осложняется, если в системе присутствует несколько флуоресцирующих соединений. Тем не менее иногда именно поляризацию флуоресценции можно использовать для разделения флуоресценции, принадлежащей разным веществам или одному и тому же веществу, находящемуся в различных состояниях в биологическом объекте. В качестве примера можно привести измерение спектров поляризации флуоресценции по испусканию. В случае индивидуального флуоресцирующего соединения, растворенного в гомогенном достаточно вязком растворителе, такой спектр в гомогенной фазе представляет собой прямую, параллельную оси длин волн. В биологических системах условия окружения вещества чаще всего бывают неоднородными, и происходят небольшие изменения в спектре флуоресценции. Однако степень поляризации флуоресценции может быть существенно различной для двух форм; в таком случае поляризация флуоресценции становится разной при разных длинах волн флуоресценции, в соответствии с изменением вклада форм вещества в суммарный спектр.

В качестве примера на рис. 2.20 приведены спектры флуоресценции зонда *N*-фенил-1-нафтиламина и зависимость  $P$  от длины

волны флуоресценции. Видно, что поляризация флуоресценции изменяется. Это позволяет рассчитать вклад каждой из флуоресцирующих компонент и расчленить суммарный спектр флуоресценции на составляющие. Спектральные характеристики двух составляющих позволяют говорить о существовании в липидном слое мембран двух зон, находясь в которых молекулы зонда обладают разными характеристиками. В частности, эти зоны различаются по микровязкости. Соотношение двух форм зонда в мембране зависит от температуры и химического состава липидного слоя.

## 2.15. Триpletное состояние биомолекул. Фосфоресценция

В замороженных растворах люминесцирующих веществ при низких температурах, например при температуре жидкого азота (77 К), в дополнение к рассмотренной выше флуоресценции, как правило, появляется новая полоса люминесценции, лежащая в более длинноволновой области. Время затухания этого свечения после прекращения возбуждающего света исчисляется иногда секундами или даже десятками секунд и, во всяком случае, превышает  $10^{-4}$  с. Такое длинноволновое медленно затухающее свечение называют фосфоресценцией. Причем спектры возбуждения флуоресценции и фосфоресценции совпадают. На рис. 2.21 представлены спектры флуоресценции, фосфоресценции и возбуждения люминесценции триптофана. На основании измерения спектров можно составить схему электронных уровней молекулы (сравни рис. 1.1).

Фосфоресценция соответствует электронному переходу с уровня  $T_1$  (триpletного), лежащего ниже уровня возбужденной молекулы  $S_1$  (синглетного). Большое  $\tau$  фосфоресценции говорит о том, что переход с этого уровня маловероятен: его вероятность на 4—9 порядков ниже, чем для флуоресценции. Поэтому А. Яблонский (1935) назвал фосфоресцентный уровень *метастабильным* (полуустойчивым). А. Н. Теренин и Г. Н. Льюис независимо друг от друга предположили, что при переходе молекулы на метастабильный уровень происходит обращение спина электрона, т. е. что такой уровень является триpletным.

Низкая вероятность прямого перехода  $T_1 \rightarrow S_0$  и, следовательно,  $T_1 \leftarrow S_0$  перехода имеет два следствия.

1. Большое излучательное время жизни триpletных молекул делает

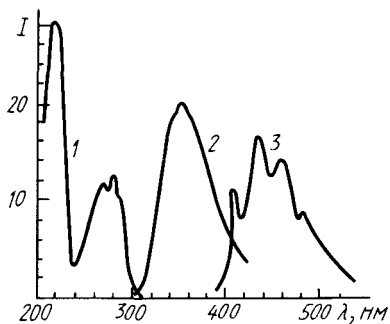


Рис. 2.21. Спектр возбуждения флуоресценции (1) и спектры флуоресценции (2) и фосфоресценции (3) триптофана



весьма вероятным тушение фосфоресценции за счет внутри- и межмолекулярных процессов тушения. Это приводит к тому, что гПиП × при комнатной температуре фосфоресценция растворов практически всегда отсутствует, в то время как флуоресценцией обладают многие соединения. Только в очень вязких растворах, например «стеклах» из застывшей борной кислоты или в замороженных жидким азотом растворах, можно наблюдать сильную фосфоресценцию многих соединений, в частности ароматических аминокислот и белков, а также нуклеотидов и т. д.

2. Полоса поглощения, соответствующая прямому переходу  $T_1 \leftarrow S_0$ , слабо выражена. Поскольку  $\epsilon$  примерно обратно пропорционален  $\tau_0$ , то  $\epsilon$  полосы  $T_1 \leftarrow S_0$  поглощения у такой молекулы, как триптофан, для которого  $\tau$  равно  $\sim 4$  с, должно быть соответственно в  $10^9$  раз меньше, чем  $\epsilon$  основной полосы поглощения, соответствующей  $S_1 \leftarrow S_0$  переходу ( $\tau$  флуоресценции равно  $10^{-9}$  с). Оптическая плотность раствора триптофана толщиной 1 см в концентрации  $2 \cdot 10^{-5}$  моль/л при 280 нм  $\approx 0,1$ . Такую же оптическую плотность даст полоса поглощения за счет  $T_1 \leftarrow S_0$  перехода, если концентрацию триптофана увеличить до 1 моль/л, а длина кюветы составит 100 м.

## 2.16. Измерение спектра, $\tau$ фосфоресценции и поглощение молекул в триплетном состоянии

Обнаружение молекул в триплетном состоянии основано на измерениях фосфоресценции, поглощения света молекулами в триплетном состоянии за счет  $T_2 \leftarrow T_1$  перехода (см. рис. 1.1) или регистрации сигнала электронного парамагнитного резонанса триплетных молекул.

Измерение спектров фосфоресценции иногда удается производить на тех же приборах, на которых измеряют флуоресценцию. Например, в случае белков фосфоресценция может быть зарегистрирована как длинноволновая часть общего спектра низкотемпературной люминесценции. Этот метод пригоден только для исследования хорошо фосфоресцирующих веществ при низких температурах, так как при комнатной температуре фосфоресценция имеет низкий квантовый выход, на несколько порядков ниже флуоресценции. Выделить фосфоресценцию из общего спектра люминесценции и рассеянного возбуждающего света можно пользуясь фосфороскопом. Работа фосфороскопа основана на том, что измерение излучения образца производится после перекрытия возбуждающего света, который, равно как и флуоресценция, не может таким образом попасть непосредственно на приемник излучения (рис. 2.22).

Благодаря применению фосфороскопа удается измерять спектры фосфоресценции при комнатных температурах, несмотря на весьма низкую интенсивность свечения. Особенно большой инте-

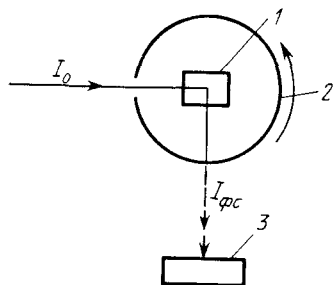


Рис. 2.22. Фосфороскоп:  
1 — кювета; 2 — вращающийся цилиндр с прорезями; 3 — детектор

рес представляет обнаруженная при комнатной температуре фосфоресценция белков, входящих в состав мембран клеток, поскольку интенсивность такой фосфоресценции оказалась чувствительным показателем состояния мембранных структур.

Измерение  $\tau$  фосфоресценции осуществить проще, чем  $\tau$  флуоресценции, так как длительность затухания фосфоресценции существенно больше. У таких соединений, как ароматические аминокислоты и белки, при температуре жидкого азота  $\tau$  исчисляется секундами

и затухание фосфоресценции после прекрывания возбуждающего света может быть записано непосредственно на самописце или на осциллографе с медленной разверткой. В случае исследования фосфоресценции с меньшими временами затухания порядка  $10^{-4}$  с, как, например, у порфиринов, образцы облучают короткой вспышкой света и затухание фосфоресценции регистрируют на осциллографе с большой скоростью развертки. Обработка кривых затухания осуществляется так же, как и в случае флуоресценции (см. раздел 2.10).

Под действием света часть молекул переходит в триплетное состояние ( $S_1 \leftarrow S_0$  и  $S_1 \rightarrow T_1$  переходы). Однако накопить в этом состоянии количество молекул, достаточное для измерений спектров поглощения триплетных молекул ( $T_2 \leftarrow T_1$  или  $T_3 \leftarrow T_1$  переходы), при обычных интенсивностях возбуждающего света не удается, так как одновременно происходит обратный процесс — переход молекул из триплетного состояния в основное. Нужна большая мощность возбуждающего светового пучка, чтобы в триплетном состоянии оказалась ощутимая часть всех молекул. Подобной мощностью обладают импульсные лампы или импульсные лазеры. Метод измерения спектров поглощения молекул в триплетном состоянии, основанный на применении импульсных ламп, был разработан Г. Портером и сотр. Этот метод получил название импульсного или флеш-фотолиза (см. разд. 4.5).

Раствор облучают вспышкой импульсной лампы, питаемой батареей конденсаторов. Энергия вспышки составляет обычно  $10 - 100$  Дж, длительность вспышки составляет всего  $10^{-3} - 10^{-5}$  с. Поэтому мощность вспышки превышает интенсивность обычных источников в  $10^5 - 10^6$  раз. Под действием такой вспышки значительная часть молекул переходит в возбужденное синглетное, а затем путем интеркомбинационной конверсии — в триплетное состояние. Это приводит, во-первых, к уменьшению оптической плотности в области основной полосы поглощения вещества, так как молекул с заселенными уровнями  $S_0$  становится

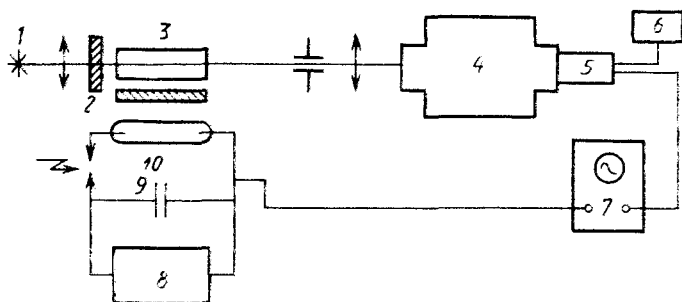


Рис. 2.23. Схема кинетической установки импульсного фотолиза: 1—спектроscopicкая лампа; 2—фильтры; 3—кювета; 4—монокроматор; 5—фотоумножитель; 6—питание ФЭУ; 7—осциллограф; 8—зарядное устройство; 9—конденсатор; 10—импульсная лампа

меньше, а во-вторых, к увеличению оптической плотности при длинах волн, где поглощают молекулы в триплетном состоянии ( $T_2 \leftarrow T_1$ ,  $T_3 \leftarrow T_2$  переходы). По мере обратного перехода молекул в исходное состояние поглощение при всех длинах волн возвращается к норме. Спектры поглощения короткоживущих состояний молекул называют *переходными*. На установке, приведенной на рис. 2.23, измеряют кинетику изменения пропускания раствора при той или иной длине волны, установленной на монохроматоре. Изменяя длину волны и регистрируя изменение оптической плотности, можно измерить спектр поглощения исходного вещества (отрицательный максимум в переходном спектре поглощения) или спектр поглощения триплетного состояния молекул (положительный максимум в переходном спектре). На рис. 2.24, а, б приведен переходный спектр поглощения триптофана, полученный С. Л. Аксеицевым, В. И. Оленевым и Е. Е. Фесенко.

Доказательством того, что поглощение облученного раствора обусловлено триплетным состоянием молекул, является совпадение времени затухания фосфоресценций  $\tau_{\text{фс}}$  со временем исчезновения переходных максимумов  $\tau_n$ , регистрируемых на установке

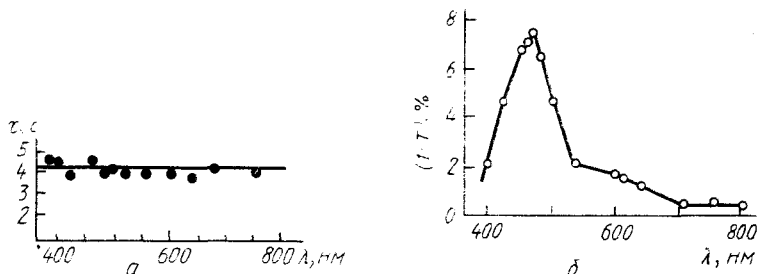


Рис. 2.24. Спектр поглощения триплетных молекул триптофана (б) и время затухания переходного спектра поглощения (а)

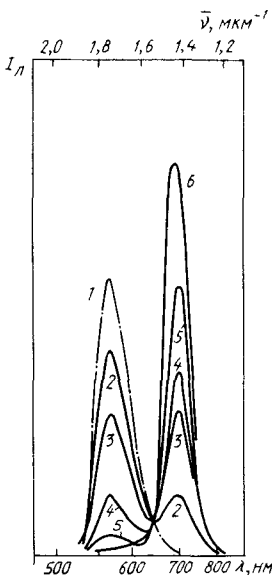


Рис. 2.25. Спектры долгоживущего испускания зойна в этаноле:

1 — быстрая флуоресценция при 22° С; 2 — долгоживущее испускание при 71° С; 3 при +43° С; 4 при 22° С; 5 при -7° С; 6 при -58° С; шкала интенсивностей для 2—6 в 1000 раз меньше, чем для 1

флеш-фотолиза. Так было найдено, что для триптофана в глицерине при 77 К  $\tau_{fc} = 4,3$  с, а  $\tau_n = 4,1$  с.

## 2.17. Замедленная флуоресценция

Измерение спектров послесвечения люминесцирующих соединений при температурах, близких к комнатной (а не при температуре жидкого азота), позволило обнаружить люминесценцию, спектр которой совпадает со спектром флуоресценции, а длительность затухания совпадает с длительностью затухания фосфоресценции. Такое послесвечение было названо *замедленной (delayed) флуоресценцией*. Пример ее дан на рис. 2.25. Было замечено, что соотношение интенсивностей полос замедленной флуоресценции и фосфоресценции при фиксированной температуре сохраняется, если осуществлять дезактивацию триплетных состояний тушителями фосфоресценции. Однако, при увеличении температуры относительный вклад замедленной флуоресценции увеличивается (см. рис. 2.26). Эти наблюдения можно объяснить тем, что для испускания замедленной флуоресценции необходима тепловая активация триплетного состояния на один из более высоких колебательных

подуровней, после чего происходит интеркомбинационная конверсия ( $S_1 \leftarrow T_1$ ).

Для количественного описания этих явлений рассмотрим кинетику процессов дезактивации триплетного состояния:

- 1) фосфоресценция  $T_1 \xrightarrow{k_{fc}} S_0 + h\nu_{fc}$ ;
- 2) замедленная флуоресценция  $T_1 \xrightarrow{k_{TS}} S_1 \rightarrow S_0 + h\nu_{fl}$ ;
- 3) тушение фосфоресценции  $T_1 + Q \xrightarrow{k_q} S_0 + Q$ .

Если найти отношение скорости излучательного перехода при фосфоресценции к сумме скоростей всех переходов, а затем проделать ту же процедуру при  $[Q] = 0$ , то получим уравнение Штерна—Фольмера (2.27). Такое же уравнение получим для тушения замедленной флуоресценции (с той же константой  $K$ ), т. е. оба процесса тушения идут параллельно. С другой стороны, можно сразу найти из сумм реакций 1 и 2

отношение интенсивностей замедленной флуоресценции к фосфоресценции:

$$I_{\text{зфл}}/I_{\text{фс}} = k_{TS}/k_{\text{фс}}. \quad (2.47)$$

Из уравнения (2.47) следует, что отношение интенсивностей свечения от тушения посторонними молекулами не зависит. Значение константы  $k_{TS}$  при повышении температуры должно расти, так как интерконверсия из  $T_1$ - в  $S_1$ -состояние включает процесс термической активации триплетов на высокий колебательный уровень, с которого осуществляется переход в  $S_1$ . Поэтому константу  $k_{TS}$  можно представить в виде

$$k_{TS} = A e^{-\frac{\Delta E}{RT}},$$

где  $A$  — константа;  $\Delta E$  — энергия активации перехода на более высокий колебательный уровень триплетного состояния.

Если учесть, что  $k_{\text{фс}} = 1/\tau_{0,\text{фс}}$ , где  $\tau_{0,\text{фс}}$  — излучательное время жизни триплетов, когда отсутствуют процессы тушения (например, в твердой матрице при температуре жидкого азота), то получим

$$\frac{\varphi_{\text{зфл}}}{\varphi_{\text{фс}}} = \tau_{0,\text{фс}} \varphi_{\text{фл}} A e^{-\frac{\Delta E}{RT}}.$$

Действительно, определенные по спектрам рис. 2.25 величины  $\ln(\varphi_{\text{зфл}}/\varphi_{\text{фс}})$  линейно зависят от обратной температуры (рис. 2.26). Полученное из наклона графика значение  $\Delta E$  совпадает с энергетической разностью между максимумами двух полос испускания, тем самым подтверждая предполагаемый механизм.

Интенсивность замедленной флуоресценции, равно как и фосфоресценции при комнатных температурах, исключительно низка из-за тушения длительно живущих триплетных состояний молекулами кислорода. Удаление кислорода, равно как и увеличение вязкости среды, усиливает замедленную флуоресценцию и фосфоресценцию. Так, например, в спектре испускания металлопорфиринов, входящих в состав мембран микроорганизмов, в отсутствие кислорода наблюдается замедленная флуоресценция с максимумами при 590 и 630 нм и фосфоресценция с максимумами 720 и 800 нм (В. Г. Петухов, Н. С. Осин). С увеличением концентрации кислорода в среде свечение тушится.

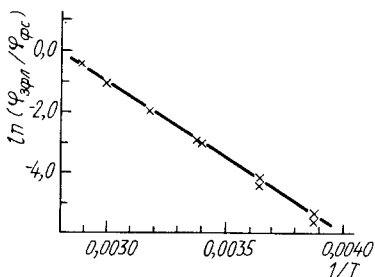
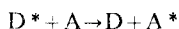


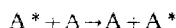
Рис. 2.26. Зависимость замедленной флуоресценции озона в этаноле от температуры

## 3.1. Явление переноса энергии

Перенос энергии электронного возбуждения между двумя молекулами можно представить в виде схемы

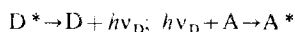


В результате переноса энергии возбужденная молекула донора энергии  $D^*$  переходит в основное (невозбужденное) состояние  $D$ , а молекула акцептора энергии переходит из невозбужденного состояния  $A$  в возбужденное  $A^*$ . Следует отметить, что донором и акцептором энергии могут быть не обязательно молекулы разных веществ, но также и разные молекулы одного и того же вещества:



Перенос энергии между одинаковыми молекулами (который может быть многократным) называют *миграцией* энергии (от лат. migratio — блуждание).

Один из возможных способов переноса энергии между молекулами донора и акцептора заключается в том, что молекула  $D^*$  излучает квант флуоресценции, а молекула  $A$  его поглощает:



Такой перенос за счет реабсорбции света флуоресценции называют *излучательным* (рассматриваться не будет). При достаточно малых расстояниях между молекулами донора и акцептора перенос становится безызлучательным.

Безызлучательный перенос энергии может происходить в момент тесного контакта молекул при их кинетических соударениях. Однако если полностью исключить возможность такого зависимо от диффузии взаимодействия молекул, например, при изучении процесса в очень вязких растворах или в стекловидной матрице, то в определенных условиях перенос энергии возбуждения будет происходить с высокой эффективностью. Рассмотрим явления, относящиеся к диффузионно-независимому переносу энергии.

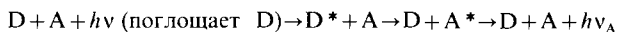
Методы изучения процесса переноса энергии между разными молекулами и миграции энергии между одинаковыми молекулами в растворах различны. В работах С. И. Вавилова для изучения миграции энергии был предложен метод измерения поляризации флуоресценции. В вязких растворах степень поляризации  $P$  равна предельной  $P_0$ . Но это характерно только для разбавленных растворов, где расстояния между молекулами велики. По мере уменьшения расстояния между молекулами начинается миграция

энергии возбуждения. Теоретические расчеты показывают, что даже однократный перенос энергии между случайно ориентированными молекулами приводит к практически полной деполяризации флуоресценции образца.

Для изучения переноса энергии между разными молекулами используют несколько приемов порознь или в сочетании.

1. Измеряют снижение квантового выхода флуоресценции донора в присутствии акцептора энергии. От динамического тушения по механизму Штерна—Фольмера (см. разд. 2.12) это явление отличается тем, что не зависит от вязкости среды.

2. Измеряют сенсibilизированную (донором) флуоресценцию акцептора энергии. Явление сенсibilизированной люминесценции заключается в том, что под действием излучения, поглощаемого в основном молекулами донора, происходит излучение квантов флуоресценции молекулами акцептора энергии:



3. Измеряют сенсibilизированную фотохимическую реакцию: действующее излучение поглощается в основном молекулами донора энергии, а молекулы акцептора вступают в фотохимический процесс.

4. Для обнаружения переноса можно измерить сокращение времени затухания флуоресценции донора ( $\tau_D$ ) в присутствии акцептора, а также увеличение  $\tau_A$  при возбуждении в полосе поглощения донора, так как при переносе от  $D^*$  к  $A$  время  $\tau_A$  включает в себя время жизни молекул донора до момента переноса энергии + время жизни возбужденного состояния акцептора энергии.

### 3.2. Теория индуктивно-резонансного переноса энергии

Теория переноса энергии электронного возбуждения между молекулами была развита в работах С. И. Вавилова, М. Д. Галанина и Т. Фёрстера на основании изучения явлений деполяризации флуоресценции растворов и сенсibilизированной флуоресценции. Согласно этой теории между донором  $D^*$  и акцептором энергии  $A$  происходит электростатическое взаимодействие по типу диполь-индуцированный диполь. Для осуществления переноса энергии необходимо выполнение условия резонанса—разность энергий между основным и возбужденным электронными уровнями обеих молекул должна быть одинакова (совпадение собственных частот осцилляторов), и условия индукции—взаимодействие между молекулами должно быть достаточно сильным. Для соблюдения этих условий необходимо выполнение следующих правил:

1) донор энергии  $D^*$  должен обладать способностью к люминесценции, так как вероятность переноса пропорциональна

константе скорости излучательного перехода в молекуле донора (определяется из отношения экспериментально измеренных  $\Phi_D/\tau_D$ );

2) спектр флуоресценции донора  $[F_D(\nu)]$  должен перекрываться со спектром поглощения акцептора  $[\epsilon_A(\nu)]$  (условие резонанса);

3) молекулы донора и акцептора должны быть достаточно сближены, так как вероятность переноса энергии обратно пропорциональна шестой степени расстояния  $R$  между ними;

4) донор и акцептор должны быть удачно ориентированы друг относительно друга (ориентационный фактор  $\Phi^2$ ). Если дипольные моменты излучения донора и поглощения акцептора перпендикулярны друг другу, то перенос энергии осуществляться не будет ( $\Phi^2=0$ ). Если направление моментов совпадает с направлением радиуса-вектора, соединяющего  $D^*$  и  $A$ , то вероятность переноса максимальна ( $\Phi^2=4$ ). В растворах при хаотической ориентации молекул и их быстром вращении  $\Phi^2=2/3$ .

Константа скорости переноса энергии  $k_n$  описывается уравнением Фёрстера:

$$k_n = \alpha \frac{\Phi^2}{R^6} \frac{\Phi_D}{\tau_D} \frac{S_{AD}}{S_D} \quad (3.1)$$

Здесь коэффициент пропорциональности  $\alpha = 9000 \cdot \ln 10 / (128 \pi^5 n^4 N)$ , где  $n$  — показатель преломления;  $\Phi_D$  — квантовый выход флуоресценции донора;  $\tau_D$  — время жизни возбужденного состояния молекул донора в отсутствие переноса энергии;  $\Phi$  — фактор взаимной ориентации векторов электронного перехода в молекуле донора при испускании и в молекуле акцептора при поглощении фотона;  $S_{AD} = \int_0^\infty F_D(\bar{\nu}) \epsilon_A(\bar{\nu}) \bar{\nu}^{-4} d\bar{\nu}$  — интеграл перекрывания спектров флуоресценции донора и поглощения акцептора;  $\bar{\nu}$  — частота излучения;  $\epsilon_A$  — молярный коэффициент поглощения акцептора;  $F_D$  — интенсивность флуоресценции донора в относительных единицах;  $S_D = \int_0^\infty F_D(\bar{\nu}) d\bar{\nu}$  — площадь под кривой флуоресценции донора; использование отношения  $S_{AD}/S_D$  позволяет нормировать интенсивности флуоресценции донора при расчете перекрывания спектров.

### 3.3. Использование индуктивно-резонансного переноса энергии для оценки расстояния между молекулами

Уравнение Фёрстера (3.1) позволяет использовать эффективность переноса энергии, определяемую экспериментально, для расчета расстояния  $R$  между молекулами донора и акцептора энергии. Один из распространенных экспериментальных методов нахождения эффективности переноса энергии заключаются в из-



мерении спектров возбуждения флуоресценции акцептора энергии в системе, где есть и донор, и акцептор. Поясним этот метод на рис. 3.1.

В растворе присутствуют молекулы D и A. Оба вещества способны люминесцировать. Спектр флуоресценции D перекрывается со спектром поглощения A. Если при измерении спектра возбуждения люминесценции вещества A будет зарегистрирована кривая I, совпадающая со спектром поглощения смеси, то это будет свидетельствовать о 100%-ном переносе энергии возбуждения от D\* к A. Кривые 2 — частичный перенос энергии, 3 — нет переноса. Для того, чтобы исключить тривиальную реабсорбцию, нужно пользоваться достаточно тонкими кюветами, оптическая плотность в максимуме поглощения A должна быть ниже 0,1. При отсутствии реабсорбции появление коротковолнового максимума на кривых I или 2 можно объяснить только переносом энергии. Флуоресценция вещества A за счет фотонов, поглощенных D, называется *сенсibilизированной*. Эффективность переноса энергии W равна отношению площади под кривой 2 к площади под кривой 1.

Аналитическое выражение для эффективности переноса энергии может быть получено из уравнения для интенсивности люминесценции акцептора, возбуждаемой монохроматическим светом (2.15). В случае переноса энергии с эффективностью W

$$I_A = \frac{K\varphi_A(1-T)(D_A + D_D)W}{D_A + D_D}, \quad (3.2)$$

где K — коэффициент пропорциональности;  $\varphi_A$  — квантовый выход флуоресценции акцептора; T — пропускание возбуждающего света;  $D_A$  и  $D_D$  — оптические плотности растворов акцептора и донора энергии по отдельности;  $D_A/(D_A + D_D)$  — доля поглощения акцептора в суммарном поглощении;  $D_D/(D_A + D_D)$  — доля поглощения донора в суммарном поглощении.

Рассмотрим связь между эффективностью W и расстоянием R. Для этого сначала найдем связь эффективности переноса энергии с вероятностью переноса  $k_{\text{п}}$  в уравнении Фёрстера (3.1). Если W — эффективная растрата энергии возбуждения, а  $(1-W)$  — неэффективная растрата, то отношение  $W/(1-W)$  равно отношению

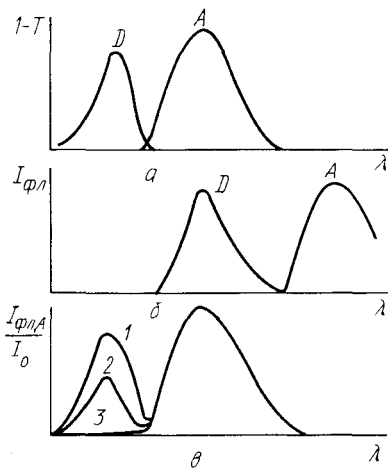


Рис. 3.1. Индуктивно-резонансный перенос энергии

Спектры: а — поглощения; б — флуоресценции; Д — донора и А — акцептора; в — возбуждения флуоресценции акцептора при 100%-ном переносе энергии от донора (1), частичном переносе (2) и в отсутствие переноса (3)

константы скорости переноса энергии  $k_{\pi}$  к константе скорости дезактивации возбужденного состояния в молекуле донора в отсутствие переноса  $1/\tau_D$  (т. е. в процессах излучательных и безызлучательных переходов  $S_1 \leftarrow S_0$ ):

$$\frac{W}{1-W} = k_{\pi} \tau_D, \quad (3.3)$$

причем  $1/\tau_D$  ни от  $k_{\pi}$ , ни от  $R$  не зависит. Назовем расстояние, при котором эффективность  $W_0 = 0,5$  (т. е.  $k_{\pi} \tau_D = 1$ ), радиусом Фёрстера  $R_0$ . Используя уравнение (3.1), из выражения (3.3) получаем

$$\frac{W}{1-W} = \left(\frac{R_0}{R}\right)^6. \quad (3.4)$$

Из уравнений (3.1) и (3.3) получаем

$$R_0^6 = \alpha \Phi^2 \frac{\Phi_D}{\tau_D} \frac{S_{AD}}{S_D}. \quad (3.5)$$

Нахождение  $R_0$  связано с определением интеграла перекрытия спектров и вычислениями по уравнению (3.5) при условии  $k_{\pi} \tau_D = 1$ . Таким образом, зная  $R_0$  и эффективность переноса энергии  $W$ , можно найти  $R$ .

Рассмотрим несколько примеров использования этого метода.

1. Определение толщины липидного бислоя (рис. 3.2, а). В серии работ были проведены исследования переноса энергии между донорными и акцепторными красителями, разделенными слоем липидов. Липосомы формировали в растворе акрифлавина (акцептор), затем снаружи краситель отмывали и добавляли 1-анилинонафтален-8-сульфанат АНС (донор). Наблюдался перенос энергии с АНС на акрифлавин.

2. Изучение связывания белков мембраной основано на измерении эффективности переноса энергии от ароматических групп белка на молекулы зонда, растворенного в липидной фазе. Поскольку точная локализация ароматических групп в большинстве случаев неизвестна, постулируют, что эти группы равномерно распределены по белковой молекуле, берут высокие концентрации зонда и считают, что со всех участков белковой молекулы, отстоящих от липидной фазы на расстояние меньше радиуса Фёрстера ( $R_0$ ), происходит 100%-ный перенос энергии, а с участков, удаленных от липидов на большее расстояние, переноса энергии не происходит. Таким образом было показано, что ацетилхолинэстераза не взаимодействует с липосомами из метилового эфира димиристоил-глицерин-3-фосфата, а мелиттин и аполипопротеид-ала взаимодействуют. Для трипсина были определены константа и число центров связывания.

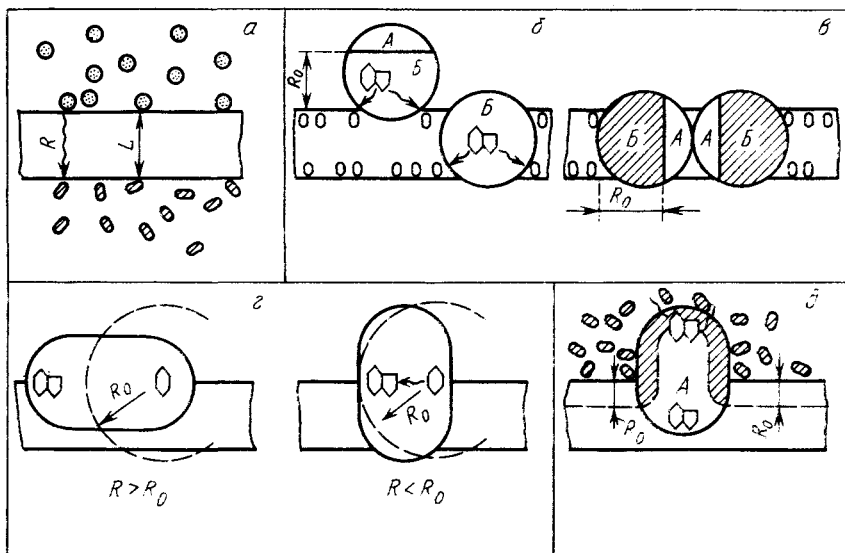


Рис. 3.2. Использование явления переноса энергии в изучении структуры биологических мембран:

*a* — определение толщины мембраны путем измерения эффективности переноса энергии от молекул водорастворимого донора (вверху) на молекулы акцептора (внизу); при высоких концентрациях донора и акцептора расстояние переноса энергии  $R$  стремится к толщине мембраны  $L$ ; *b* — определение расположения белка на мембране. Если в части белка *A*, удаленной от липида на расстояние больше  $R_0$  (радиус Фёрстера), имеются остатки триптофана, энергия с них не переносится на зонд, локализованный в мембране. Недоступный для тушения зондом участок *A* отсутствует у белка, погруженного в бислой (справа); *c* — изучение агрегации белков в мембране. Недоступные для тушения зондом участки белка *A* образуются в местах сближения белков, если там нет зонда. С участков *B* происходит перенос энергии от триптофана на зонд; *d* — изучение конформационных перестроек белка по изменению эффективности переноса энергии от тирозиновых остатков на триптофановые, расстояние между донором и акцептором  $R > R_0$  — перенос энергии малоэффективен,  $R < R_0$  — происходит перенос энергии; *e* — изучение погружения триптофановых остатков в глубь мембраны. Погруженные остатки не тушатся акцептором энергии, растворенным в водной фазе

3. Изучение расположения белковой глобулы в мембране. При изучении расположения белков в мембранах микросом печени и саркоплазматического ретикулума использовали в качестве акцептора пирен. В обеих мембранах происходил перенос энергии с остатков триптофана мембранных белков на пирен (рис. 3.2. *b*), что вызывало рост интенсивности флуоресценции пирена при возбуждении 286 нм и тушение флуоресценции белка. В саркоплазматическом ретикулуме предельное тушение флуоресценции белков составляло 77%. Это позволило рассчитать, что белок был погружен в глубь бислоя на  $\sim 1$  нм, а остальная часть молекулы  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-азы выступает над поверхностью бислоя на 4 нм. Несмотря на ряд исходных допущений, анализ переноса энергии приводит практически к такой же модели АТФ-азы, которая следует из данных электронной микроскопии. Изучение переноса энергии — ароматические группы-зонд, наблюдали в мембранах

эритроцитов, субмитохондриальных частицах, в электровозбудимых мембранах, в мембранах аксона и целых клеток.

4. Оценка расстояния белок—холестерин. Флуоресцирующие аналоги холестерина холеста-5,7,9(11)триен-3 $\beta$ -ол(В-ХТЕ) и олеилхолестерина (олеоил-В-ХТЕ) вводили в липопротеиды высокой и низкой плотности. Оба зонда были акцепторами энергии, переносимой с остатков триптофана апопротеидов. Поскольку перенос на В-ХТЕ в 2—3 раза оказался более эффективным, чем на олеоил-В-ХТЕ, был сделан вывод, что белок липопротеидов контактирует со свободным холестерином, а не с его эфирами.

5. Определение расположения гема относительно липидного бислоя. Один из наиболее важных вопросов молекулярной мембранологии—это расположение активных центров мембранных белков относительно липидной фазы мембраны. Зонд 4-диметиламинохалкон (ДМХ) располагается в поверхностном слое липидной фазы. Его флуоресценция должна эффективно тушиться гемами, так как перенос энергии с ДМХ на гем должен происходить на расстоянии 3—6 нм. Действительно, интенсивность флуоресценции ДМХ (при соотношении ДМХ/липид→0) в митохондриях оказалась несколько ниже, чем в митохондриальных липидах. Однако разница невелика. Это свидетельствует о том, что большинство полярных групп липидов в митохондриях удалено более чем на 3 нм от гемов цитохромов. Переноса энергии с АНС на гем не происходило также в реконструированных комплексах цитохрома *c* с липидами.

6. Изучение конформационных изменений в мембранных белках. Большинство белков, в том числе мембранных, обладает собственной флуоресценцией. При этом внутри белковой молекулы часто наблюдается перенос энергии с остатков тирозина на индольные группы триптофана, который зависит от расстояний между ними (рис. 3.2, *z, d*). При связывании липофилина (белок миелина) с лецитиновыми мембранами возрастал квантовый выход флуоресценции белка, но снижалась эффективность внутри-белкового переноса энергии. Первый факт свидетельствует о погружении белка в липидный слой, второй—о том, что при этом конформация белка изменяется и его молекула становится шире. Такой подход может оказаться плодотворным и в других случаях.

Приведенные примеры показывают, что внимательное изучение явления переноса энергии может дать много полезных сведений об организации белково-липидной системы биомембран.

### 3.4. Обменно-резонансный перенос энергии

Обменно-резонансный тип переноса энергии был открыт в 1952 г. А. Н. Терениным и В. Л. Ермолаевым. Перенос энергии происходит только при непосредственном контакте молекул. Вместе с тем он может осуществляться лишь в том случае, если

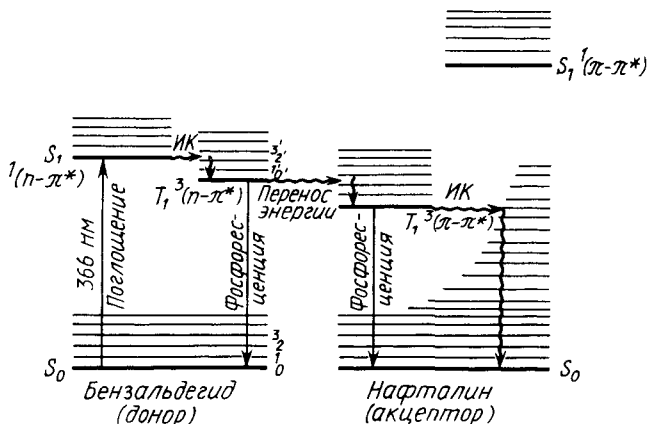
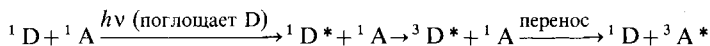


Рис. 3.3. Обменно-резонансный перенос энергии от бензальдегида на нафталин

электронные оболочки находящихся рядом молекул  $D^*$  и  $A$  перекрываются. Расстояние переноса в отсутствие диффузии невелико и составляет 1,1 — 1,3 нм, что соответствует концентрациям акцептора 0,2 — 0,3 М. По обменному механизму может протекать синглет-синглетный и триплет-триплетный переносы энергии.

Наибольший интерес вызывает триплет-триплетный механизм



Экспериментально обнаружить такой перенос удалось благодаря подбору удачных пар донор — акцептор, в частности бензальдегид и нафталин. У бензальдегида  $S_1$  состояние находится ниже  $S_1$  состояния нафталина (рис. 3.3). Если облучать эту смесь при 366 нм, то можно возбуждать только донор, нафталин же поглощает излучение с  $\lambda < 310$  нм. Тем самым исключается непосредственное возбуждение акцептора, а также синглет-синглетный перенос энергии от  $D^*$  к  $A$  из-за несоблюдения условия резонанса. В то же время  $T_1$  уровень нафталина находится ниже уровня бензальдегида; это благоприятствует протеканию триплет-триплетного переноса энергии. Сенсibilизированную бензальдегидом фосфоресценцию нафталина наблюдали при 77 К в растворителе эфир — этанол.

Константа скорости переноса  $k_{op}$  по теории Д. Л. Декстера и В. Л. Ермолаева определяется выражением

$$k_{op} = kZ^2 \frac{\int_0^{\infty} f_D(\nu) \varepsilon_A(\nu) d\nu}{\int_0^{\infty} f_D(\nu) d\nu \int_0^{\infty} \varepsilon_A(\nu) d\nu}, \quad (3.6)$$

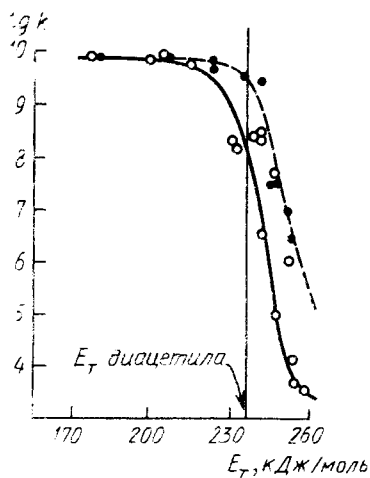
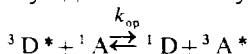


Рис. 3.4. Триplet-триpletный перенос энергии от диацетила к различным акцепторам в бензольных растворах при комнатной температуре: зависимость констант скорости от энергии триплетов акцептора  $E_T$  (○) —  $k_q$  — наблюдаемая константа скорости тушения; (●) —  $k_{ET}$  — константа скорости переноса, исправленная на обратный перенос)

тушения  $k_q$  близка к диффузионной, что указывает на высокую эффективность переноса при столкновениях молекул (рис. 3.4). Были получены также значения констант  $k_q$  и  $k_{op}$ . Заметим, что  $k_q = k_{op}$ , если перенос энергии осуществляется только в одну сторону, от  ${}^3D^*$  к  ${}^1A$ . Но если энергии  ${}^3D^*$  и  ${}^3A^*$  сравнимы, то образовавшаяся возбужденная молекула  ${}^3A^*$  может снова передавать свою энергию возбуждения молекуле  ${}^1D$ :



В таком случае наблюдаемая величина  $k_q$  будет меньше, чем  $k_{op}$  (см. рис. 3.3). Когда  $T_1$  акцептора ниже  $T_1$  донора на 15 кДж/моль и более, то  $k_q \approx k_{op} \approx k_{диф}$ . Если  $T_{1,A} > T_{1,D}$  и для переноса требуется термическая активация, то  $k_q$  и  $k_{op}$  быстро уменьшаются. Причем всегда  $k_q < k_{op}$  из-за обратного переноса энергии от  ${}^3A^*$  на  ${}^1D$ . Когда энергии  ${}^3D^*$  и  ${}^3A^*$  одинаковы, то перекрываются только 0,0' — полосы спектра испускания  ${}^3D^*$  и  $T_1 \leftarrow S_0$  спектра поглощения  ${}^1A$ . Это приводит к уменьшению  $k_{op}$  в соответствии с (3.6).

Х. Бекстрем и К. Сандрос (1960) наблюдали в жидких растворах явление сенсibilизированной фосфоресценции и показали, что бензофенон в отсутствие кислорода в жидком растворе в бензоле или изопропанолe при 293 К может сенсibilизировать фосфоресценцию диацетила, бензила или анизила.

где  $k$  — экспериментальная константа;  $z^2$  — величина, пропорциональная обменному интегралу, характеризующему электростатическое взаимодействие между двумя электронными облаками;  $\int_0^\infty f_D(v) \varepsilon_A(v) dv$  — интеграл перекрывания спектра фосфоресценции донора и спектра  $T_1 \leftarrow S_0$  поглощения акцептора.

В жидких растворах триplet-триpletный перенос энергии обнаружили Х. Бекстрем и К. Сандрос (1958). В качестве донора энергии ими был выбран диацетил, способный ярко фосфоресцировать в бензольных растворах при комнатной температуре в отсутствие кислорода. Измеряли сокращение  $\tau$  фосфоресценции диацетила в присутствии различных ароматических углеводородов, имеющих  $T_1$ -уровень ниже и выше  $T_1$ -уровня диацетила. Показано, что если  $T_1$ -уровень акцептора ниже  $T_1$ -уровня донора, то константа

В настоящее время известно небольшое число примеров обменно-резонансного переноса энергии в биологических системах. Так, предполагается, что в листьях растений за счет обменно-резонансного переноса происходит тушение триплетных возбужденных состояний хлорофилла каротиноидами. А. А. Красновским (мл) показано, что в листе  $\Phi_{\text{fc}}$  хлорофилла в  $\sim 2000$  раз ниже, чем в растворе. Каротиноиды путем тушения триплетов хлорофилла предотвращают фотогенерацию хлорофиллами синглетного кислорода, тем самым защищают фотосинтетический аппарат от окислительного повреждения. Известно, что бескаротиноидные мутанты фотосинтезирующих организмов гибнут на свету.

Возможно, что в двуспиральной ДНК происходит триплет-триплетный перенос энергии между нуклеотидами (см. разд. 5.1) в сторону тимина, что способствует преимущественному образованию именно тиминовых димеров при УФ-облучении ДНК.

Явление обменно-резонансного переноса энергии находит применение в некоторых биологических экспериментах, в частности для активации хемилюминесценции (см. гл. 9). Севченко и др. (1963) было показано, что в хелатах редкоземельных металлов происходит обменно-резонансный перенос энергии от триплетного состояния органического лиганда на редкоземельный ион, который испускает после этого яркую люминесценцию. Это явление было использовано Ю. А. Владимировым и др. В суспензию биологических частиц добавлялись ионы  $\text{Eu}^{3+}$ , в результате на 2—3 порядка активировалась хемилюминесценция вследствие переноса энергии от триплетных кетонов и альдегидов, образовавшихся в ходе химических реакций, на  $\text{Eu}^{3+}$ .

### 3.5. Перенос энергии в кристаллах

Я. И. Френкель (1931) пришел к выводу о невозможности локализации энергии возбуждения в одной определенной молекуле в такой системе одинаковых молекул, как кристалл. Он предсказал необходимость переноса энергии возбужденного состояния по кристаллу и назвал это возбужденное состояние, подобно частице, — *экситон* (excitation — возбуждение).

Экспериментальные доказательства миграции экситона в кристаллах были получены при изучении сенсibilизированной флуоресценции в смешанных кристаллах. Ф. Вейгарт обнаружил, что если в кристаллах антрацена содержится примесь тетрацена (0,1—0,001%), то спектр флуоресценции кристалла совпадает со спектром тетрацена, хотя все возбуждающее излучение поглощает антрацен. В кристаллах фенилаланина с примесью триптофана,

как показали исследования Ю. А. Владимирова и др., происходит перенос экситона от фенилаланина на триптофан. Большое биологическое значение имеет миграция в двумерных кристаллах хлорофилла, т. е. в мономолекулярных пленках хлорофилла в мембранах хлоропластов. Квант света, поглощенный любой молекулой из «энергетического ансамбля» в сотни молекул, мигрирует между молекулами до тех пор, пока не попадет на молекулу, входящую в фотохимический центр фотосинтеза, где имеется весь набор участников первичных реакций фотосинтеза и где энергия этого кванта превращается в химическую фотопродуктов.

А. Н. Теренин и другие показали, что в кристаллах возможна миграция не только между синглетными, но и между триплетными уровнями молекул, причем миграция такого триплетного экситона не менее эффективна, чем синглетного. Так, в кристаллах бензола триплетный экситон может посетить за время своего существования  $10^{11}$ — $10^{13}$  молекул, тогда как синглетный — только 10—100 молекул. Возможно, это связано с большей длительностью жизни молекул в триплетном состоянии, но несомненно говорит о том, что между молекулами в кристалле существует исключительно большая вероятность переноса энергии возбужденного состояния за счет обменного взаимодействия, вследствие, по-видимому, заметного перекрывания электронных орбиталей. Возможно, что по такому механизму происходит перенос энергии между нуклеотидами в спирализованной ДНК при УФ-облучении.

В кристаллах полупроводников миграция энергии возбужденного состояния происходит путем перемещения электрона в зоне проводимости и дырки — в валентной зоне. Было сделано много попыток доказать полупроводниковые свойства у биологических систем, таких, как белковые молекулы, нуклеиновые кислоты, биомембраны и т. д. Как известно, тепловое возбуждение молекул в полупроводнике приводит к заселению полосы проводимости и появлению электрической проводимости  $\rho$ , которая зависит от температуры согласно уравнению

$$\rho = \rho_0 \exp(-\Delta E/2kT).$$

Этим методом изучались полупроводниковые свойства белков, нуклеиновых кислот, хлоропластов. Измерение электрической проводимости приходится проводить в сухих пленках, чтобы исключить возможность переноса электричества за счет диффузии ионов, растворенных в воде. При этом было показано, что белки имеют при комнатной температуре исключительно высокое сопротивление, т. е. ведут себя как хорошие изоляторы. Энергия активации электрической проводимости (ширина запрещенной зоны  $\Delta E$ ) оказалась равной



2,6—3,1 эВ. Это указывало на то, что белки, хоть и плохие, но полупроводники. Однако позднее было обнаружено, что при пропускании через пленки белков электрического тока на катоде выделяется водород в количестве, пропорциональном пропущенному току. Скорее всего энергия активации электрической проводимости белковых пленок—это не более чем энергия активации ионизации различных групп белка, поставляющих ионы в окружающую белок пленку адсорбированной воды.

Таким образом, в настоящее время отсутствуют доказательства полупроводниковых свойств биологических объектов.

## РАЗДЕЛ II

# ПЕРВИЧНЫЕ СТАДИИ ФОТОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

### ГЛАВА 4

## ОСНОВНЫЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ В ФОТОХИМИИ

### 4.1. Фотобиологические процессы и их стадии

Изучение биофизических аспектов фотобиологических процессов является центральным разделом квантовой биофизики. К фотобиологическим относят процессы, начинающиеся с поглощения кванта света биологически важной молекулой и заканчивающиеся какой-либо физиологической реакцией (позитивной или негативной) на уровне организма. К таким процессам относятся:

фотосинтез — синтез органических молекул за счет энергии солнечного света;

фототаксис — движение организмов, например бактерий, к свету или от света;

фототропизм — поворот листьев или стеблей растений к свету или от света;

зрение — превращение световой энергии в энергию нервного импульса в сетчатке глаза или в аналогичных фоторецепторах;

действие ультрафиолетовых лучей (бактерицидное или бактериостатическое действие на микроорганизмы, мутагенное действие, канцерогенное действие, образование витамина D из провитаминов, эритемное действие на кожу, образование загара, терапевтические эффекты).

К фотобиологическим процессам также может быть отнесена биохемилюминесценция (сверхслабые свечения, биолюминесценция) (см. гл. 9). (Здесь, наоборот, определенные биохимические реакции сопровождаются появлением электронно-возбужденного продукта с последующим испусканием кванта люминесценции.)

Фотобиологические процессы весьма разнообразны. Каждый из них состоит из многих стадий, начиная с акта поглощения кванта света и кончая физиологическими реакциями на уровне целого организма. Условно всякий фотобиологический процесс можно разбить на несколько стадий: 1) поглощение кванта света; 2) внутримолекулярные процессы размена энергией (фотофизические процессы); 3) межмолекулярные процессы переноса энергии воз-

бужденного состояния; 4) первичный фотохимический акт; 5) темновые реакции, заканчивающиеся образованием стабильных продуктов; 6) биохимические реакции с участием фотопродуктов; 7) общефизиологический ответ на действие света.

В настоящей книге будут рассмотрены преимущественно начальные, физико-химические стадии фотобиологических процессов. Первые три стадии фотохимического процесса одинаковы для процессов фотохимии и люминесценции; поэтому законы фотохимии имеют свои аналоги с законами люминесценции (см. гл. 3). Первичный фотохимический акт — это процесс, в который вступает молекула из нижнего синглетного  $S_1$  или триплетного  $T_1$  возбужденного состояний.

Квантовый выход  $\Phi$  — это отношение числа прореагировавших молекул к числу поглощенных фотонов. В случае первичных стадий фотохимических реакций квантовый выход равен отношению числа возбужденных молекул вещества, вступающих в фотохимический процесс, к общему числу возбужденных молекул:

$$\begin{aligned}
 A * &\xrightarrow{k_1} P \text{ (продукты реакции)} \\
 A * &\xrightarrow{k_2} A \\
 \Phi &= dP/dA * = k_1/(k_1 + k_2).
 \end{aligned}
 \tag{4.1}$$

В реальных условиях опыта квантовый выход можно определять, измеряя убыль исходного вещества  $\Delta A$  или накопление продукта реакции  $\Delta P$  за конечное время  $t$  под действием облучения объекта монохроматическим светом с интенсивностью ( $I$  эйнштейн/с):

$$\Phi = -\Delta A/[It(1-T)],
 \tag{4.2}$$

где  $(1-T)$  — коэффициент поглощения;  $It$  — доза облучения.

Определяемый в опыте квантовый выход  $\Phi$  зависит от условий эксперимента. Так, поглощение действующего света продуктами реакции или посторонними веществами будет снижать  $\Phi$ , а развитие цепных реакций, инициируемых первично образовавшимися радикалами, может привести к высоким квантовым выходам образования продуктов реакции (значительно больше единицы!). Для понимания механизма фотохимического процесса особенно важен квантовый выход первичной реакции, определяемый по (4.1).

#### 4.2. Фотохимический спектр действия

Одна из задач при изучении фотобиологических процессов — определение вещества, которое поглощает действующее излучение и тем самым участвует в первых стадиях процесса. Для этого изучают спектр фотохимического действия и сравнивают его со спектрами

поглощения предполагаемых участников реакции. Сущность такого подхода мы поясним на примере фотохимической инактивации ферментов при ультрафиолетовом облучении. Особенность этой реакции состоит в том, что она протекает по *одноударному механизму*: под действием поглощенного кванта молекула либо совсем не изменяется, либо полностью инактивируется, вероятность инактивации и есть квантовый выход инактивации  $\Phi$ .

Рассмотрим кинетику этого процесса. Пусть в кювете толщиной  $l = 1$  см находится разбавленный раствор фермента в концентрации  $n$  молекул в  $1 \text{ см}^3$  ( $\text{см}^{-3}$ );  $s$  ( $\text{см}^2$ ) — поперечное сечение поглощения фермента (1.5);  $I_0$  и  $I$  ( $\text{см}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ ) — интенсивности падающего и прошедшего через раствор света, выраженные числом квантов на  $1 \text{ см}^2$  в секунду). Каждую секунду раствор будет поглощать  $(I_0 - I) \text{ см}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ , при этом в растворе площадью  $1 \text{ см}^2$  инактивируется ежесекундно

$$-\frac{dn}{dt} = \Phi(I_0 - I) \quad (4.3)$$

молекул, где  $\Phi$  — квантовый выход фотохимической реакции. Величины  $I_0$ ,  $I$ ,  $s$  и  $l$  связаны между собой по закону Бугера — Ламберта — Бера (1.5). Из уравнений (4.3) и (1.5) при  $l = 1$  см находим

$$-\frac{dn}{dt} = \Phi I_0 (1 - e^{-snl}). \quad (4.4)$$

В разбавленных растворах, где  $snl < 0,1$ , выражение в скобках (4.4) приблизительно равно  $snl$  (погрешность  $< 5\%$ ). Тогда можно написать, что

$$-\frac{dn}{dt} = \Phi I_0 snl. \quad (4.5)$$

Интегрирование выражения (4.5) дает

$$\ln \frac{n_0}{n_t} = I_0 t s \Phi = D \sigma, \quad (4.6)$$

где  $D = I_0 t$  — доза облучения;  $\sigma = s \Phi$  — поперечное сечение инактивации фермента, имеет размерность площади.

Для определения  $\sigma$  строят график зависимости  $\ln(n_0/n_t) = f(D)$  (рис. 4.1), величина  $\sigma$  определяет наклон прямой. Поскольку при  $n_0/n_t = e$   $\ln(n_0/n_t) = 1$  можно найти  $\sigma$  непосредственно из дозовой кривой инактивации  $\sigma = 1/D_{37\%}$ , где  $D_{37\%}$  — доза облучения, при которой осталось неразрушенными  $37\%$  молекул.

При значительной оптической плотности раствора необходимо постоянное перемешивание, но тем не менее каждая молекула поглощает меньше световой энергии в единицу времени из-за экранирующего действия других молекул в растворе. В случае

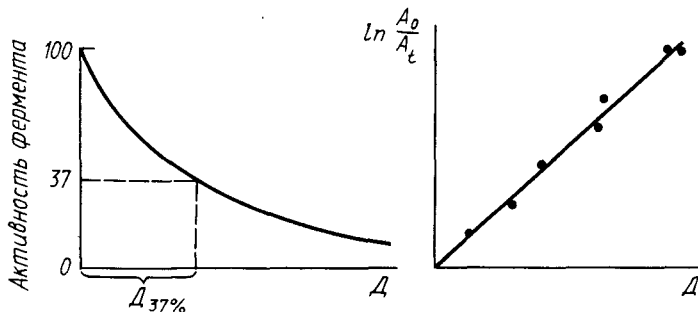


Рис. 4.1. Определение поперечного сечения инактивации фермента:  $A_0$  и  $A_t$ —активности фермента перед облучением и после облучения дозой  $D_t$ .

сложной оптически плотной смеси веществ, в которой оптическая плотность образца ( $D$ ) не изменяется в ходе облучения, уравнение (4.3) усложняется [напоминает (2.10)] и принимает вид

$$-\frac{dn}{dt} = \Phi I_0 (1-T) \frac{D_A}{D}, \quad (4.7)$$

где  $D_A$ —оптическая плотность вещества, участвующего в фотохимической реакции.

Подставим в уравнение (4.7)  $s_A n_A l / \ln 10$  вместо  $D_A$ , разделим переменные и проинтегрируем, получаем

$$\ln \frac{n_0}{n} = I_0 t s \Phi \frac{l(1-T)}{\ln 10 D} = D \sigma K, \quad (4.8)$$

где  $K$ —константа, учитывающая экранировку фотолизируемого вещества.

При нужной длине волны следует измерить оптическую плотность  $D$ , рассчитать коэффициент экранировки  $K$  и затем найти  $\sigma$  из уравнения (4.8).

В фотохимии *спектром действия* называют зависимость  $\sigma$  от длины волны действующего света (рис. 4.2).

Как и квантовый выход люминесценции, квантовый выход фотохимических реакций органических молекул в растворах не зависит от длины волны действующего света. Это было экспериментально подтверждено еще в работах О. Варбурга с сотр., изучавших действие света на белковые системы. Так как  $\Phi$  от длины волны не зависит, то, поскольку  $\sigma = s\Phi$ , спектр действия  $\sigma(\lambda)$  для индивидуального вещества по форме соответствует спектру его поглощения  $s(\lambda)$ . Измерив (в разбавленных растворах) по дозовым кривым спектр действия, можно определить спектр поглощения участвующего в процессе вещества, не проводя никаких спектрофотометрических измерений. Именно это и обуславливает интерес к регистрации спектров действия в фотобиологии.

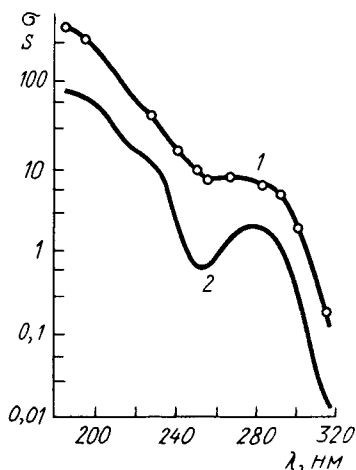


Рис. 4.2. Спектр действия фотоинактивации (1) и спектр поглощения трипсина (2)

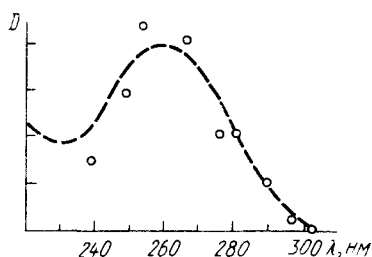


Рис. 4.3. Спектр действия возникновения мутаций у кукурузы: ---- оптическая плотность, (○) эффективность УФ-индукции мутаций

Сравнительно простой случай — определение спектров действия фотоинактивации белков. На рис. 4.2 представлен спектр действия фотоинактивации трипсина. В трипсине есть три главных хромофора — остатки триптофана, тирозина и цистина, которые и обуславливают спектр поглощения. Как видно из спектра действия, для инактивации белка существен фотолитиз всех трех аминокислот, так как спектр действия близок суммарному спектру поглощения этих аминокислот.

Точно так же было установлено, что кривая гибели бактерий под действием ультрафиолета имеет максимум в области 265 нм и форма этой кривой напоминает спектр поглощения нуклеиновых кислот (Ф. Л. Гейтс, 1930). Поэтому был сделан вывод, что гибель бактерий под действием УФ-излучения связана с повреждением нуклеиновых кислот. Аналогичное наблюдение было сделано при изучении мутагенного действия ультрафиолета. Спектр действия (рис. 4.3) возникновения мутаций у кукурузы оказался идентичным спектру поглощения нуклеиновых кислот (Л. Дж. Стадлер, 1942).

В случае сложных фотобиологических процессов, когда конечному эффекту предшествуют частично обратимые фотохимические процессы и темновые стадии, уравнение (4.6) может не соблюдаться, и неясно, как определить  $\sigma$  для построения спектра действия. Обычно в этом случае по ординате откладывают величину *эффективности света* Э, обратную дозе  $D_c$ , вызывающей определенный фотобиологический эффект, одинаковый для всех длин волн:

$$\mathcal{E} = 1/D_c.$$

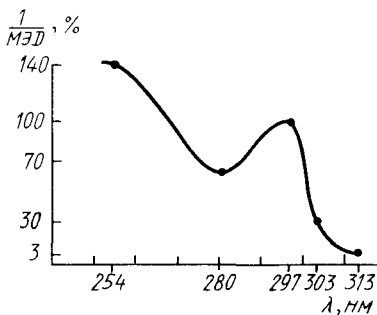


Рис. 4.4. Спектр действия УФ-эритемы кожи человека

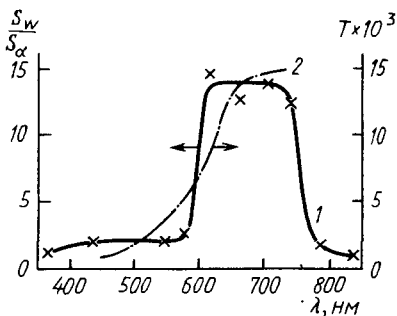


Рис. 4.5. Спектр действия фотопериодической стимуляции полового созревания утят:

$S_w/S_\alpha$  — отношение размеров семенников в конце и начале опыта (1); спектр пропускания (2) тканей головы утят со стороны глазных орбиталей до гипоталамуса (фоторецептора)

На рис. 4.4 по оси ординат отложена именно такая величина —  $1/\text{МЭД}$ , МЭД — минимальная эритемная доза, т. е. доза облучения, вызывающая минимальную обнаруживаемую эритему. Подобную величину используют при построении спектров действия загара человека, фототропизма и фототаксиса растений, чувствительности глаза и т. д.

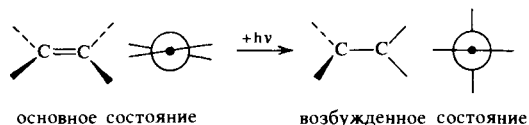
При изучении спектров действия в сложных биологических системах может происходить усложнение сравнительно простой ситуации, изложенной выше, за счет эффектов экранировки. Суть экранирующего эффекта заключается в том, что часть падающего на объект света поглощается в верхних слоях этого объекта, и в его глубине интенсивность действующего света оказывается ниже по сравнению с интенсивностью падающего света, измеряемой экспериментатором. Примером могут служить фотобиологические процессы, протекающие в коже человека и животных. До хромофоров в клетках доходит свет, ослабленный поверхностными слоями кожи (например, роговым слоем), т. е. имеет место оптическое экранирование, которое будет искажать регистрируемый спектр действия эритемы (рис. 4.4).

На рис. 4.5 изображен спектр действия фотопериодической стимуляции полового созревания утят, осуществляемый через фотостимуляцию гипоталамуса. Здесь экранировка проявляется особенно сильно, так как прежде чем дойти до гипоталамуса, свет должен пройти через ткани головы. Максимум спектра находится в области наилучшего пропускания — в красном свете. Определение спектра действия в данном фотобиологическом процессе позволило дать практические рекомендации по режиму освещения.

### 4.3. Изменение свойств молекул в электронно-возбужденном состоянии

Свойства молекул в возбужденном и основном состояниях отличаются по многим параметрам.

1. У органических молекул с системой сопряженных двойных связей при возбуждении изменяется *пространственная структура*. В невозбужденном состоянии вращение двух частей молекулы вокруг двойной связи невозможно и такие молекулы имеют плоскую конфигурацию. Наименьшую энергию молекула имеет при перекрывании  $\pi$ -орбиталей, поэтому  $\pi$ -орбитали называют *связывающими*. Возбужденные состояния в первый момент после поглощения фотона сохраняют плоскую конфигурацию основного состояния (принцип Франка—Кондона). Но возбужденные  $\pi^*$ -орбитали являются разрыхляющими: наименьшую энергию имеет конформация, в которой  $\pi$ -связь разрывается и две части молекулы поворачиваются вокруг  $\sigma$ -связи на  $90^\circ$ . Этот процесс имеет большое значение при фотохимических превращениях зрительного пигмента родопсина (см. гл. 8).



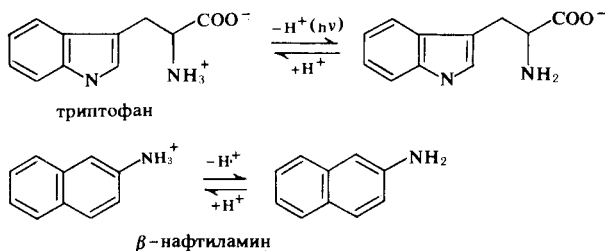
2. Происходит изменение дипольного момента молекул (см. разд. 2.6).

3. Изменение кислотно-основных свойств молекул при возбуждении изучают, используя различные методы титрования. Обычно диссоциированная и недиссоциированная формы молекул обладают различными спектрами поглощения и люминесценции. Измеряя спектры поглощения или люминесценции при различных рН, можно, таким образом, определять кривые диссоциации молекул. Так как поглощает свет молекула в основном состоянии, спектрофотометрически определяют кривую диссоциации невозбужденных молекул.

Высвечивание кванта люминесценции происходит из возбужденного (синглетного или триплетного) состояния, поэтому люминесцентным методом регистрируют кривую диссоциации молекул в возбужденном состоянии. Оказывается, что эти кривые диссоциации отличаются друг от друга (рис. 4.6). Для триптофана в области рН 9—10, т. е. там, где диссоциируют аминогруппы, отчетливо видна разница в величинах  $pK$  основного и нижнего синглетного возбужденных состояний. А именно  $pK$ , измеренное по поглощению, равно 9,8, тогда как  $pK_{S_1}^*$ , измеренное по флуоресценции, равно 9,1. Это означает, что аминогруппа трипто-



фана в возбужденном состоянии обладает менее выраженными щелочными свойствами, чем в основном:



Как следует из формулы триптофана, диссоциирующая  $\text{NH}_3$ -группа отделена от системы  $\pi$ -электронов, ответственных за поглощение и люминесценцию, двумя одинарными связями. Тем не менее возбуждение триптофана приводит к смещению электронной плотности к индольному кольцу и уменьшению энергии связывания протона с аминогруппой. Естественно, что более заметные изменения  $pK$  в возбужденном состоянии наблюдаются для групп, непосредственно связанных с ароматическими кольцами. Например, для  $\beta$ -нафтиламина  $pK=4,1$ ;  $pK_{S_1}^*=-2,0$ . Значения  $pK_{T_1}^*$  триплетного состояния значительно ближе к  $pK$  основного, чем  $pK_{S_1}^*$  возбужденного синглетного состояния. Для  $\beta$ -нафтиламина  $pK_{T_1}^*=3,3$ . Эти результаты подчеркивают большие различия химической реакционной способности синглетных и триплетных состояний.

4. К фотохимическим превращениям молекулы, поглотившей фотон, приводят резкие изменения ее донорно-акцепторных свойств. В возбужденной молекуле высвобождается электронная вакансия на верхней заполненной орбитали, в результате чего молекула становится акцептором электрона, способным вступать в реакции фотовосстановления с подходящими донорами. Примером такой реакции может служить открытая А. А. Красновским (1948) реакция фотовосстановления хлорофилла. Это открытие имело фундаментальное значение в познании процесса фотосинтеза. Наряду с этим в возбужденной молекуле появляется электрон на сравнительно высоко расположенной нижней свободной орбитали. В результате этого молекула становится донором электрона и легко вступает в реакции фотоокисления. Так, ароматические аминокислоты способны отдавать эле-

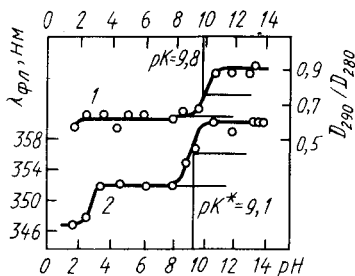
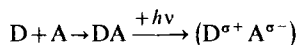


Рис. 4.6. Кривые диссоциации триптофана в основном (1) и синглетном возбужденном (2) состояниях

ктрон просто молекулам среды, т. е. при поглощении ими в растворе кванта происходит фотоионизация.

#### 4.4. Комплексы с переносом заряда

Надмолекулярные соединения, которые образуются при переносе электрона от молекулы, служащей донором  $D$  электронов, к молекуле-акцептору  $A$  электронов, называют комплексами с переносом заряда (КПЗ). Причем эти две молекулы удерживаются вместе за счет электростатического притяжения и более слабых взаимодействий, таких, как ван-дер-ваальсовы силы, водородные связи и т. д. Как правило, перенос заряда в невозбужденном состоянии комплекса незначителен. Однако при поглощении фотонов таким донорно-акцепторным комплексом происходит электронный переход из  $S_0$  состояния донора в  $S_1$  состояние акцептора (рис. 4.7), что соответствует частичному или полному переносу электрона от  $D$  к  $A$ :



Электронному переходу с переносом заряда принадлежит новая широкая и бесструктурная полоса поглощения, отсутствующая у отдельных компонентов. Образовавшийся при возбуждении комплекс растрчивает свою энергию в нескольких процессах. Возможны: обратный излучательный переход с переносом заряда из  $S_1$  акцептора в  $S_0$  донора (флуоресценция КПЗ), внутренняя конверсия в КПЗ, а также фотохимическое необратимое изменение молекул, входивших в КПЗ. Если триплетный уровень донора имеет меньшую энергию, чем возбужденный синглетный уровень акцептора, то может произойти интеркомбинационная конверсия с

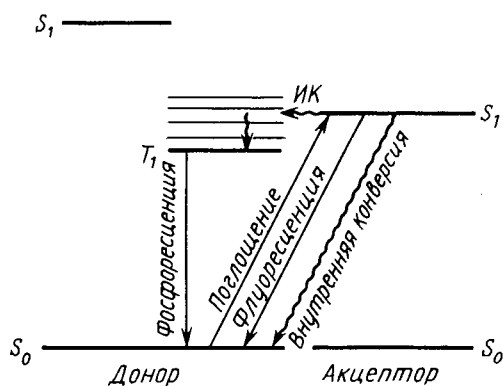


Рис. 4.7. Схема электронных переходов с переносом заряда

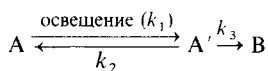
последующим излучением фосфоресценции донора (рис. 4.7). Считают, что КПЗ легко образуются между кислородом и различными полимерами (такому КПЗ приписывают полосу поглощения вплоть до 400 нм), а также кислородом и многими ароматическими соединениями, например бензолом. Электронный переход с переносом заряда с определенной вероятностью заканчивается

окислением органических молекул. Типичными акцепторами в КПЗ являются хиноны, полинитроароматические соединения и т. д., типичные доноры — ароматические углеводороды, диеновые структуры и т. д. Предполагается, что фотохимические реакции некоторых сенсibilизаторов протекают с участием КПЗ. Например, М. Кроу и Т. Г. Траскотт (1983) показали, что триплетные возбужденные состояния 8-метоксисоралена (8-МОП) тушатся 3,4-диоксифенилаланином (ДОФА) по механизму переноса заряда. В результате образуются свободные радикалы 8-МОП и ДОФА. В отсутствие кислорода этот процесс обратим, в присутствии  $O_2$  он завершается окислением ДОФА. Предполагают, что генерация синглетного кислорода (см. гл. 6) триплетными состояниями фотосенсibilизаторов происходит через стадию образования комплекса с переносом заряда. Эти комплексы участвуют в передаче энергии от молекулы сенсibilизаторов на молекулу кислорода.

Донорно-акцепторные комплексы с переносом заряда между возбужденной и невозбужденной молекулами разных веществ называют *эксиплексами*. Образование эксиплексов может проявляться в том, что в спектрах флуоресценции ароматических соединений в присутствии тушителей, доноров или акцепторов электрона появляется новая полоса, смещенная в длинноволновую сторону.

#### 4.5. Методы изучения первичных фотопродуктов

Первичные продукты фотохимических реакций (молекулы в электронно-возбужденных состояниях и свободные радикалы) крайне неустойчивы и быстро переходят либо в исходные вещества, либо в более устойчивые фотопродукты (новые молекулы). Поэтому концентрация первичных фотопродуктов в обычных условиях облучения в жидких растворах бывает настолько низка, что их не удастся исследовать обычными физико-химическими методами. Упрощенно фотохимическая реакция может быть представлена схемой



где  $A'$  — первичный лабильный фотопродукт;  $B$  — стабильный фотопродукт;  $k_1$ ,  $k_2$  и  $k_3$  — константы скоростей соответствующих мономолекулярных реакций. Для таких систем накопление продукта  $A'$  во времени описывают кинетическим дифференциальным уравнением

$$\frac{d[A']}{dt} = k_1[A] - (k_2 + k_3)[A'].$$

В стационарных условиях облучения скорость изменения концентрации  $A'$  мала.  $d[A']/dt \approx 0$ , откуда

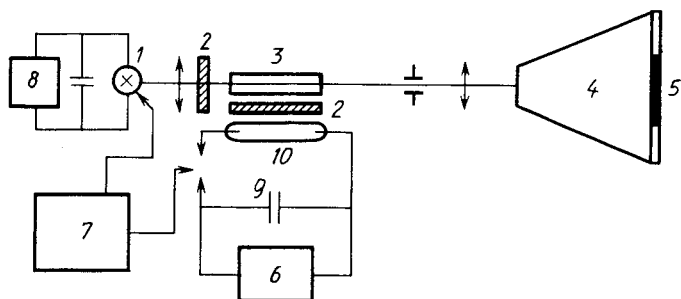


Рис. 4.8. Спектрографическая установка импульсного фотолиза: 1 — спектроскопическая лампа; 2 — светофильтры; 3 — кювета; 4 — спектрограф; 5 — фотолампа; 6 — зарядное устройство; 7 — блок временной задержки; 8 — питание импульсной спектроскопической лампы; 9 — конденсатор; 10 — импульсная лампа

$$\frac{[A']}{[A]} = \frac{k_1}{k_2 + k_3}$$

В разбавленных растворах скорость световой реакции образования  $A'$  может быть выведена из уравнений (4.5) и (4.6):

$$\left(\frac{d[A']}{dt}\right)_{\text{обр}} = k_1 [A] = I_0 \Phi_s [A] = I_0 \sigma [A],$$

откуда

$$\frac{[A']}{[A]} = \frac{I_0 \sigma}{k_2 + k_3} \quad (4.9)$$

Из (4.9) очевидно, что увеличить относительную концентрацию неустойчивого фотопродукта  $A'$  можно либо увеличением интенсивности действующего света  $I_0$ , либо замедлением скорости темновых процессов (снизить  $k_2$  и  $k_3$ ).

Первый способ реализуется в методе *импульсного фотолиза*, разработанном Р. Г. В. Норишем и Г. Б. Портером (1949). Метод основан на освещении образца очень яркой фотолизирующей вспышкой, при которой в возбужденное состояние переходит одновременно значительная доля молекул исследуемого вещества. Как следствие этого сразу после вспышки лабильные фотопродукты образуются в достаточно высоких концентрациях, позволяющих проводить их спектральное определение. Уже через несколько микро- или миллисекунд эти фотопродукты вновь исчезают. Обнаружение и идентификация лабильных продуктов основана на измерении спектров их поглощения (переходных спектров) и определении времени жизни продуктов по кинетике выцветания их переходных спектров поглощения.

В настоящее время используют в основном два типа установок импульсного фотолиза — кинетическую (см. рис. 2.23) и спектрографическую (рис. 4.8). Кинетическая установка позволяет получить

непосредственно кинетическую кривую гибели промежуточного продукта на одной длине волны регистрации. При помощи спектрографической установки регистрируется весь спектр промежуточных продуктов через определенный промежуток времени после фотолитической вспышки. Разрешающее время обычных установок импульсного фотолиза, в которых применяют импульсные лампы,  $10^{-6}$ — $10^{-5}$  с. С развитием лазерной техники путем использования импульсных лазеров удалось уменьшить это время до  $10^{-12}$  с.

Метод импульсного фотолиза позволяет непосредственно следить за кинетикой гибели триплетных молекул в растворе при обычных температурах. Так как триплет-триплетные переходы не запрещены (нет ограничений по спине), то поглощение при этих переходах характеризуется такими же высокими значениями молярных коэффициентов поглощения, как и при синглет-синглетных переходах. Производят определение коэффициентов поглощения, квантовых выходов интеркомбинационной конверсии и констант скоростей тушения триплетных состояний исследуемого вещества различными тушителями. При исследовании тушения измеряют время жизни триплетов в отсутствие и присутствии тушителей, расчет констант проводят по уравнению Штерна—Фольмера (2.32). Определяют также свободные радикалы и время их жизни в различных условиях.

В некоторых случаях помимо импульсного фотолиза применяют *метод импульсного радиолиза*. Оба метода основаны на принципе импульсного возбуждения: в первом случае образец облучается вспышкой света, во втором — импульсом ионизирующей радиации. Регистрирующие системы в этих двух методах идентичны. При использовании ионизирующей радиации поглощение не зависит от химической структуры исследуемого вещества и приводит к генерации быстрых электронов в среде как целом. В разбавленных растворах почти все излучение поглощается растворителем. Несмотря на то что на первичной стадии механизм возбуждения сильно различается в фотолизе и радиолизе, однако вслед за возбуждением образуются сходные продукты, т. е. свободные радикалы и синглетные и триплетные возбужденные состояния. Особенность радиолиза заключается в том, что в некоторых случаях триплетные состояния образуются, минуя синглетное возбужденное состояние. Поэтому радиолиз удобен для изучения триплетных состояний веществ, имеющих низкую или равную нулю константу скорости интеркомбинационной конверсии, без использования триплетных фотосенсибилизаторов. Например, в эту категорию веществ попадают каротиноиды, переходные спектры поглощения которых, полученные импульсным радиолизом, приведены на рис. 4.9.

Альтернативным импульсному радиолизу при изучении нестойких промежуточных продуктов фотохимических реакций можно

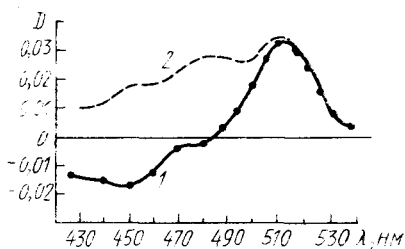


Рис. 4.9. Переходные спектры поглощения β-каротина при импульсном радиоллизе в гексане:

1 — измеренный спектр; 2 — спектр, исправленный с учетом уменьшения поглощения основным состоянием β-каротина

и замороженных образцах первичные продукты удается накопить в количествах, достаточных для исследования спектрофотометрическими или радиоспектроскопическими методами. Так, при 77 К спектры триплет-триплетного поглощения часто удается измерять непосредственно в процессе облучения обычными (не импульсными) источниками возбуждающего света. Свободные радикалы, замороженные в ледяной матрице, могут долго храниться после выключения возбуждающего света, что позволяет изучать их методами спектрального анализа или ЭПР и др.

Чувствительность метода ЭПР сравнительно велика. В водных растворах при положительных температурах удается обнаруживать  $10^{-8}$  моль · л<sup>-1</sup> свободных радикалов. Однако при обычных условиях фотобиологического эксперимента стационарные концентрации бывают ниже  $10^{-8}$  моль · л<sup>-1</sup>. Поэтому спектры ЭПР регистрируют, как правило, при облучении замороженных растворов (4.9). Интересная особенность низкотемпературной фотохимии заключается в том, что концентрация триплетных возбужденных состояний  $T_1$  повышается настолько, что они успевают поглотить второй фотон света и перейти в более высокое триплетное состояние  $T_2$  (см. рис. 1.1). Из высоких триплетных состояний легко осуществляется фотоионизация ароматических аминокислот, фурукумаринов и др. В жидких растворах при использовании обычных источников света такие двухфотонные процессы невозможны из-за малого времени жизни триплетных состояний и, как следствие, их низкой концентрации. Необходимость изучать свободные радикалы в жидких растворах привела к разработке комбинированных приборов импульсного фотолиза или радиолиза и ЭПР-спектрометров. Спектры ЭПР строят на основании кинетических измерений сигналов ЭПР при нескольких фиксированных значениях напряженности магнитного поля  $H$ . В пионерских работах по импульсному ЭПР удавалось измерять свободные радикалы через  $\sim 1$  мкс после вспышки света или импульса ионизирующего излучения.

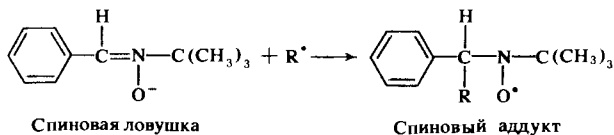
считать метод стабилизации этих продуктов за счет понижения температуры, (замораживания образцов жидким азотом). Глубокое охлаждение не влияет заметно на первичный фотохимический акт и, как правило, образование свободных радикалов, но сказывается на величинах констант скоростей дезактивации возбужденной молекулы и приводит к резкому торможению темновых превращений первичных фотопродуктов, т. е.  $k_2$  и  $k_3$  в уравнении (4.9) резко уменьшаются. Поэтому в охлажденных

Идентификацию фотопродуктов с их переходными спектрами в импульсном фотолизе и радиоллизе часто проводят с помощью ингибиторов. Известно, что молекулярный кислород с диффузионной константой тушит триплетные возбужденные состояния органических молекул. Таким же свойством обладают парамагнитные ионы ( $Mn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  и др.), тогда как непарамагнитные ( $Ca^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  и др.) тушат триплетные состояния гораздо хуже. Эффективным тушителем триплетов является  $\beta$ -каротин.

Были предложены разного рода ловушки первичных свободнорадикальных продуктов. Угнетающее действие ловушек на накопление конечных продуктов фотохимической реакции может служить указанием на то, что свободные радикалы действительно участвуют в процессе. Так, цистеин, цистин,  $KNO_3$ ,  $N_2O$  имеют высокое сродство к электрону и поэтому эффективно ингибируют реакции с участием сольватированных электронов, захватывая последние. *t*-Бутанол и другие спирты перехватывают  $\cdot OH$ -радикалы.

Ингибиторный анализ бывает полезен при изучении механизма физиологических процессов в таких сложных системах, как кожа и другие органы и ткани, в которых прямое обнаружение первичных фотопродуктов физико-химическими методами крайне затруднено. Например, антиоксиданты ионол, витамин Е и другие имеют низкий потенциал ионизации, легко отдают электрон свободным радикалам, тем самым ингибируя свободнорадикальные реакции (см. разд. 7.2 и 7.4).

Новая возможность исследования свободных радикалов при физиологических условиях появилась благодаря разработке метода спиновых ловушек. Эти соединения реагируют с короткоживущими свободными радикалами, образуя стабильные (долгоживущие) свободные радикалы (спиновые аддукты), спектры ЭПР которых измеряют в жидких растворах. Примером ловушки может служить *S*-фенил-*N*-третбутилнитрон (ФБН):



Стабильность нитроксидного радикала ФБН объясняется тем, что атом кислорода, на котором локализован неспаренный электрон, пространственно экранирован тремя метильными группами. Форма спектров ЭПР спиновых аддуктов ФБН зависит от природы присоединившегося к ФБН свободного радикала (рис. 4.10, табл. 4.1). Таким образом удается проводить исследование свободнорадикальных реакций в биообъектах методом ЭПР при физиологических температурах.

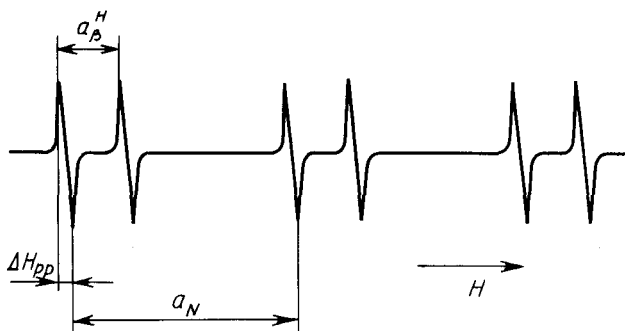


Рис. 4.10. Спектр ЭПР спинового аддукта С-фенил-N-трет-бутилнитрона

Таблица 4.1. Параметры спектров ЭПР спиновых аддуктов ФБН

Присоединяемый к ФБН свободный радикал	Параметры спектров ЭПР аддукта		
	$a_N \cdot 10^{-4}$ , Гл	$a_B^H \cdot 10^{-4}$ , Гл	$\Delta H_{PP} \cdot 10^{-4}$ Гл
$\cdot\text{OH}$	15,5	2,9	0,5
$\text{HO}\cdot$	14,9	2,9	0,3
$\cdot\text{CH}_2\text{OH}$	16,0	3,8	1,1
$\text{CH}_3-\dot{\text{C}}\text{H}-\text{OH}$	16,0	3,4	1,0
$\text{C}_2\text{H}_5-\dot{\text{C}}\text{H}-\text{OH}$	16,2	3,6	0,7
$\text{CH}_2\cdot\text{OH}-\dot{\text{C}}\text{OH}-\text{CH}_2\text{OH}$	15,9	3,5	1,0

## ГЛАВА 5

### ФОТОХИМИЧЕСКОЕ ПОВРЕЖДЕНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ, БЕЛКОВ И ЛИПИДОВ БИОМЕМБРАН

#### 5.1. Действие УФ-излучения на нуклеиновые кислоты

Даунс и Блант (1877) обнаружили, что УФ-излучение инактивирует бактерии. В последующие годы число работ, посвященных биологическому действию ультрафиолета, росло в геометрической прогрессии, но механизмы, лежащие в основе процесса, оставались по-прежнему неясными. Историческими вехами стали два открытия, связанные с измерением спектров действия.

Ф. Л. Гейтс (1928) показал, что спектр действия гибели бактерий соответствует спектру поглощения нуклеиновых кислот. Л. Дж. Стадлер и Ф. М. Угер (1942) обнаружили, что спектр действия мутаций у кукурузы также совпадает со спектром поглощения нуклеиновых кислот. Таким образом, было выяснено, что основной мишенью при летальном и мутагенном действии ультрафиолетовых лучей служат нуклеиновые кислоты.



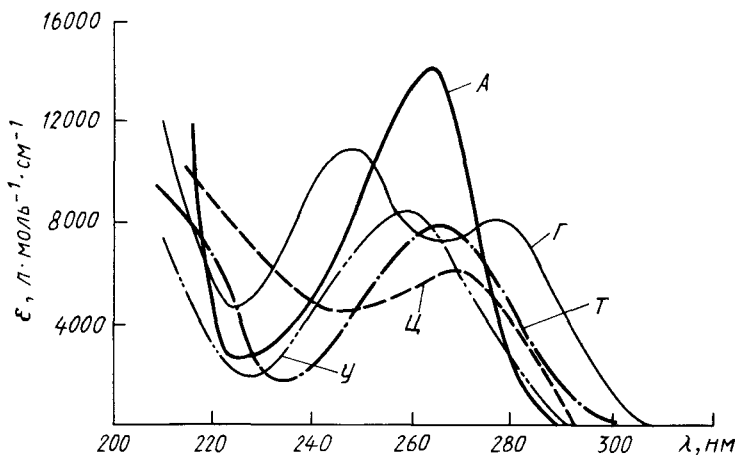


Рис. 5.1. Спектры поглощения оснований нуклеиновых кислот

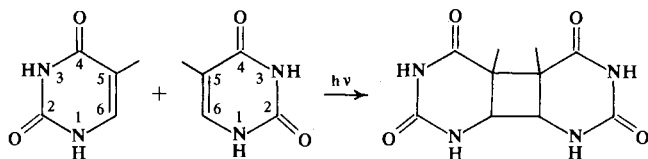
В нуклеиновых кислотах излучение в области 200—315 нм поглощается пуриновыми [аденин (А) и гуанин (Г)] и пиримидиновыми [цитозин (Ц), тимин (Т) и урацил (У)] азотистыми основаниями нуклеотидов (рис. 5.1). За поглощение ответственны в основном  $\pi$ -электроны, в длинноволновой части спектра (280—315 нм) небольшой вклад вносят  $n-\pi^*$ -переходы с участием неподеленной пары электронов гетероатомов азота и кислорода. Гидролиз ДНК до смеси свободных нуклеотидов сопровождается сдвигом полосы поглощения с 258 до 267 нм и одновременным увеличением оптической плотности на 70% (*гиперхромный эффект*). При денатурации двуспиральной ДНК наблюдаются аналогичные изменения, хотя они выражены меньше, чем при гидролизе: величина гиперхромного эффекта составляет 40%. Основания нуклеиновых кислот, а также ДНК и РНК при комнатных температурах и нейтральных рН имеют крайне низкие квантовые выходы флуоресценции ( $\sim 10^{-4}$ ) и соответственно малые времена жизни синглетных возбужденных состояний ( $\sim 10^{-12}$  с). Выраженная люминесценция нуклеиновых кислот и оснований наблюдается только при крайних значениях рН, а также при низких температурах.

Наибольший прогресс в фотохимии нуклеиновых кислот начался в 60-е годы, после того как Р. Бейкерс и В. Берендс открыли реакцию фотохимической димеризации тимина в ДНК. Вскоре было установлено, что димеризация тимина играет существенную роль в инактивации бактерий и вирусов. Есть еще два типа фотореакций, которым принадлежит важная биологическая роль: это фотогидратация и образование сшивок ДНК-белок.

Прежде чем перейти к рассмотрению фотохимии нуклеиновых кислот, отметим, что фотохимически наиболее лабильны пирими-

диновые основания, значительно более стабильны пуриновые основания и углеводные остатки нуклеиновых кислот. Поэтому далее будет обсуждаться механизм повреждения только пиримидиновых оснований ДНК и РНК.

Димеризация пиримидиновых оснований была впервые обнаружена в опытах на замороженных растворах тимина. Она заключается в ковалентном фотоприсоединении двух молекул с участием двойных связей у 5-го и 6-го атомов углерода:



Между основаниями образуется циклобутановое кольцо. Интерес к этой реакции резко возрос после того, как была показана ее ведущая роль при повреждении молекул ДНК. Например, на кишечной палочке было показано, что 50% инактивирующего действия ультрафиолета на трансформирующую ДНК можно отнести за счет димеризации тимина, а остальные 50% приходятся на долю всех остальных фотохимических реакций. Такой вклад этой реакции наблюдается не всегда. Обычно в нативной молекуле ДНК тиминовые димеры образуются между соседними тиминами одной цепи. Иногда образуются димеры между тиминами комплементарных тяжей. Однако в двуспиральной ДНК в силу комплементарности оснований тимина никогда не могут быть расположены друг против друга. Поэтому для димеризации тиминов из комплементарных тяжей необходимо, чтобы тимин одного тяжа оказался рядом с тимином другого тяжа. Это возможно только при локальной денатурации ДНК — локальном расплетении комплементарных тяжей и сближении тиминов. Фотохимическая димеризация закрепляет такую локальную денатурацию, т. е. в ДНК появляется устойчивый структурный дефект.

Вызвать мономеризацию димеров нагреванием или химическими реагентами не удастся. Однако есть фотохимическая реакция мономеризации димеров. Причем если спектр действия фотодимеризации близок к суммарному спектру поглощения всех оснований ДНК, то спектр действия мономеризации располагается в более коротковолновой области и соответствует спектру поглощения только тиминовых димеров. На рис. 5.2 видно, что если облучение проводить в области длин волн более 280 нм, то будет преобладать процесс димеризации, а при облучении ~240 нм — мономеризации. Используя различные длины волн действующего света, можно при длительном облучении добиться различных стационарных концентраций тиминовых димеров. На рис. 5.3 показано, что при длительном облучении политимидиновой кислоты ~280 нм в димерную форму переходят 65% всех

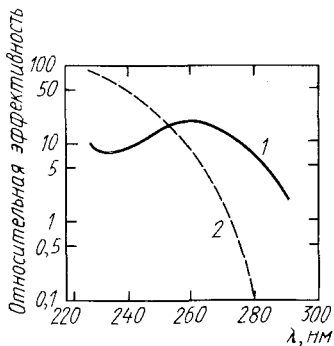


Рис. 5.2. Спектры действия димеризации тимина (1) и фотоомономеризации димеров (2) в политимидиновой кислоте

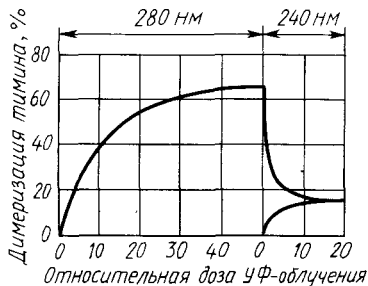


Рис. 5.3. Зависимость степени димеризации тимина в политимидиловой кислоте от длины волны и дозы облучения

тиминов, а облучение того же образца при 240 нм приводит к установлению нового стационарного уровня, когда 17% тиминов находятся в димерной форме.

Вследствие бимолекулярного характера реакции фотодимеризации ее квантовый выход зависит от взаимного расположения остатков тимина. Если тимины расположены в соседних положениях, как, например, в политимидиловой кислоте, то квантовый выход димеризации может составлять 0,02. В природных ДНК он значительно ниже. Квантовый выход димеризации изменяется при любых воздействиях, влияющих на пространственную структуру ДНК, например при изменении влажности, температуры и т. д. Поэтому реакция фотодимеризации может быть использована для изучения пространственной структуры ДНК.

Спектр действия димеризации тимина близок спектру поглощения суммы всех азотистых оснований ДНК. Это означает, что димеризация тимина происходит не только за счет фотонов, поглощенных самим тиминном, но и в результате фотосенсибилизации другими основаниями ДНК. При физиологических условиях основания нуклеиновых кислот обладают низкими квантовыми выходами и временем жизни флуоресценции. Следовательно, вероятность индуктивно-резонансного переноса энергии между основаниями очень мала, так как, по Фёрстеру (3.1), донор должен обладать способностью к флуоресценции. При снижении температуры возрастают время жизни и выход флуоресценции, однако даже при таких условиях, по данным исследования поляризации флуоресценции полинуклеотида аденина, заметной индуктивно-резонансной миграции между нуклеотидами не происходило. Значительно более вероятна обменно-резонансная миграция энергии с участием триплетных состояний нуклеотидов.

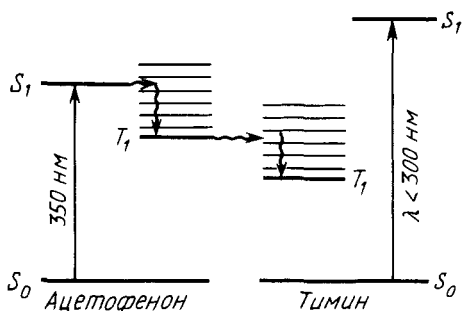


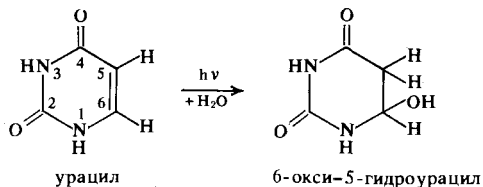
Рис. 5.4. Схема действия сенсбилизатора ацетофенона при УФ-облучении (350 нм) комплекса ДНК-ацетофенон

Измерение спектров фосфоресценции показало, что энергия триплетных состояний мононуклеотидов убывает в последовательности Ц, Г, А, Т. Это позволяет предполагать, что при благоприятных условиях может протекать перенос энергии от цитозина к тимину. Соответственно, в реакцию димеризации должны вступать триплетные состояния тимина. Способность остатков тимина димеризоваться в составе ДНК через триплетное состояние была доказана в опытах по избирательному переводу остатков тиминов в триплетное состояние, минуя синглетное возбужденное состояние. Для этого к ДНК добавляли фотосенсбилизатор ацетофенон, имеющий большую константу интеркомбинационной конверсии и характеризующийся относительно тимина структурой энергетических уровней, изображенной на рис. 5.4. Так как триплетный уровень ацетофенона в воде лежит ниже триплетных уровней аденина, гуанина и цитозина, в этом случае происходит исключительно возбуждение тимина. Облучая такую систему ~ 350 нм (ДНК здесь совсем не поглощает), удалось перевести все смежные остатки тимина ДНК в димеры.

Тушители триплетных состояний, например кислород, снижают скорость димеризации тимина в растворе. Однако кислород не влияет на димеризацию тимина в составе ДНК. Это можно объяснить тем, что в ДНК смежным тиминам не нужно для осуществления димеризации тратить время на диффузионное сближение, тогда как тушение кислородом лимитируется скоростью диффузии. Если ДНК окрасить различными акридиновыми красителями, то эти красители блокируют летальные повреждения, вызванные ультрафиолетом. Г. Б. Завильгельский и сотр. показали, что особенно эффективен акрихин, защищающий инфекционную ДНК фага на 96%. Защитное действие акридиновых красителей может быть связано с триплет-триплетным переносом энергии с ДНК на краситель.

Тиминовые димеры в настоящее время наиболее исследованы. Им принадлежит ведущая роль в УФ-повреждении ДНК. С меньшей вероятностью могут образовываться димеры типа Ц—Ц и Т—Ц.

Другой важной реакцией фотоповреждения нуклеиновых кислот является *фотогидратация* пиримидиновых оснований. В результате фотогидратации цитозина и урацила образуются 6-окси-5-гидропроизводные:



Накопление этих производных было продемонстрировано в растворах свободных цитозина и урацила, а также в РНК и одноцепочечной ДНК, тогда как в двухцепочечной ДНК они не обнаруживаются. Можно думать, что фотогидратация идет через синглетные возбужденные состояния, так как тушители триплетных состояний (кислород) не влияют на скорость фотогидратации. Триплетные фотосенсибилизаторы, избирательно переводящие пиримидиновые основания в триплетное состояние, не приводят к сенсибилизации фотогидратации. Под действием света не удается вызвать обратную реакцию с регенерацией исходных пиримидиновых оснований, однако фотогидраты не устойчивы к нагреванию, при повышении температуры происходит реакция, обратная гидратации.

Под действием ультрафиолета образуются *сшивки ДНК с белками*. Первое указание на возникновение таких сшивок сделано К. Смитом, обнаружившим, что ДНК из облученных клеток кишечных палочек экстрагируется хуже, чем из необлученных. После гидролиза белков протеолитическими ферментами экстрагируемость ДНК восстанавливалась. Эта реакция в растворе была воспроизведена при облучении смеси ДНК и бычьего сывороточного альбумина. При облучении смесей цитозина или урацила с некоторыми аминокислотами (серин, цистин, метионин, лизин, аргинин, гистидин, триптофан, тирозин и фенилаланин) эти аминокислоты ковалентно присоединялись к пиримидиновым основаниям по 5-му или 6-му атомам углерода. Например, одним из продуктов является 5-S-цистеин-6-гидроурацил. При определенных условиях возможно образование сшивок ДНК—ДНК.

При очень больших дозах УФ-облучения происходит разрыв цепей ДНК. Однако выход одностебельных разрывов на два-три порядка ниже, чем выход других типов повреждения ДНК. Им принадлежит меньшая биологическая роль.

Помимо фотоповреждения нуклеиновых кислот в клетках протекает другой важнейший фотобиологический процесс— *фотореактивация*. А. Келнер (1949) обнаружил, что под действием видимого света в клетках бактерий «залечиваются» повреждения, индуцированные ультрафиолетом. Спектр действия фотореактивации бактерий расположен в области 300—500 нм с максимумом при 380 нм. Однако выделенный из бактерий фотореактивирующий фермент не обладает собственным поглощением в ближнем ультрафиолете и в видимой области. Дело в том, что хромофор-

ная группа образуется при формировании комплекса между фотореактивирующим ферментом и циклобутановыми димерами пиримидиновых оснований. В таком комплексе видимый свет вызывает распад димеров с регенерацией исходных оснований. Бактериальный фермент оказался активным, если его добавляли к клеткам млекопитающих. Позднее фотореактивирующий фермент был выделен и из клеток человека. В лимфоцитах или фибробластах человека спектр действия фотореактивации располагается в области 300—600 нм с максимумом при 400 нм. Таким образом, фотореактивация ответственна за заживание самых распространенных повреждений нуклеиновых кислот при УФ-облучении: эта реакция осуществляет мономеризацию пиримидиновых димеров.

## 5.2. УФ-повреждение белков и аминокислот

Поглощение пептидных связей имеет максимум в области 180—190 нм, который уменьшается практически до нуля к 240 нм. Остатки цистина и цистеина в молекулах белка дают монотонно возрастающую от 300 нм в коротковолновую область полосу поглощения. Наиболее значительным поглощением обладают ароматические аминокислоты триптофан, тирозин и фенилаланин, имеющие длинноволновые максимумы соответственно около 285, 280 и 258 нм, хвост поглощения простирается примерно до 310 нм. Спектры действия инактивации белков в целом повторяют их спектры поглощения (см. разд. 4.2). В зависимости от длины волны действующего излучения вклад повреждения различных аминокислотных остатков будет меняться. Мерой вероятности разрушения данного аминокислотного остатка служит величина поперечного сечения фотохимической реакции  $\sigma$  (табл. 5.1).

Под действием солнечного ультрафиолета, имеющего коротковолновую границу  $\sim 285$  нм, наибольший вклад в фотоповреждение белков дают ароматические аминокислоты триптофан и тирозин.

Имеющиеся хромофорные группы белка можно разделить на существенные и несущественные для сохранения активности фермента. Некоторые аминокислотные остатки могут распола-

Таблица 5.1. Фотохимическая чувствительность аминокислот при 254 нм

Соединение	Фотохимические свойства		
	$\epsilon$ , л/(моль·см)	$\Phi$	$\sigma \cdot 10^{20}$ , см <sup>2</sup>
Цистин (S—S-связь)	270	0,13	13,4
Триптофан	2870	0,004	4,4
Фенилаланин	140	0,013	0,69
Тирозин	320	0,002	0,23
Апетилаланин (пептидные связи)	0,2	0,05	0,004
Гистидин	0,24	<0,03	<0,0027

гаться далеко от активного центра фермента и их разрушение не приводит к изменению конформации белка и изменению активности. С другой стороны, энергия фотонов, поглощенных одним остатком, может переноситься на другие остатки аминокислот. Чтобы выяснить, какие аминокислотные остатки разрушаются на самом деле, нужно наряду со спектрами действия инактивации фермента измерять степень разрушения различных аминокислот при различных длинах волн и дозах облучения.

Пусть из  $n_i$  остатков данной аминокислоты в белке  $m_i$  остатков существенны для сохранения активности белка. Если поперечное сечение разрушения данного типа аминокислотных остатков (например, триптофана) — величина постоянная и равна  $\sigma_i$ , то сумма всех поперечных сечений фотолиза аминокислотных остатков, существенных для инактивации белка, будет равна

$$\sigma_1 m_1 + \sigma_2 m_2 + \dots = \sum_i \sigma_i m_i,$$

а поперечное сечение инактивации белка  $\sigma_6$  равно

$$\sigma_6 = \sum_i \sigma_i m_i. \quad (5.1)$$

Если облучение проводится при длинах волн более 240 нм, как это обычно бывает в фотохимических экспериментах, то можно не учитывать не поглощающие в этой области пептидные связи и алифатические аминокислоты. Наиболее важны в этом случае цистин (точнее связь S—S), тирозин и триптофан. Тогда вместо (5.1) можно написать выражение

$$\sigma_6 = \sigma_{\text{ц}} m_{\text{ц}} + \sigma_{\text{тир}} m_{\text{тир}} + \sigma_{\text{трип}} m_{\text{трип}}. \quad (5.2)$$

В уравнении (5.2)  $\sigma_6$  находится из дозовой кривой инактивации белка, а  $\sigma_{\text{ц}}$ ,  $\sigma_{\text{тир}}$ ,  $\sigma_{\text{трип}}$  — из дозовых кривых фотолиза S—S-связи, тирозинового и триптофанового остатков в данном белке. Если все эти величины известны, надо еще выяснить, сколько аминокислотных остатков цистина, тирозина и триптофана являются существенными, т. е. чему равны  $m_{\text{ц}}$ ,  $m_{\text{тир}}$  и  $m_{\text{трип}}$ . Решение проблемы заключается в использовании монохроматического облучения белка светом различных длин волн, по-разному поглощаемому этими аминокислотами, например 254, 280 и 289 нм. В этом случае находят значение  $\sigma$  для всех длин волн и записывают систему уравнений:

$$\begin{aligned} m_{\text{ц}} \sigma_{\text{ц}}^{254} + m_{\text{тир}} \sigma_{\text{тир}}^{254} + m_{\text{трип}} \sigma_{\text{трип}}^{254} &= \sigma_6^{254}, \\ m_{\text{ц}} \sigma_{\text{ц}}^{280} + m_{\text{тир}} \sigma_{\text{тир}}^{280} + m_{\text{трип}} \sigma_{\text{трип}}^{280} &= \sigma_6^{280}, \\ m_{\text{ц}} \sigma_{\text{ц}}^{289} + m_{\text{тир}} \sigma_{\text{тир}}^{289} + m_{\text{трип}} \sigma_{\text{трип}}^{289} &= \sigma_6^{289}, \end{aligned}$$

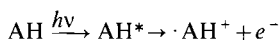
из которых можно найти значения искомых величин  $m_{\text{ц}}$ ,  $m_{\text{тир}}$ ,  $m_{\text{трип}}$ . Используя такой метод, удалось показать, например, что в пепсине разрушение только одного остатка триптофана

приводит к инактивации фермента, а остальные несущественны для сохранения его активности. В трипсине существенными оказались один остаток триптофана и одна дисульфидная связь из соответственно 4 и 6 имеющихся остатков.

Итак, наибольшую роль в УФ-инактивации белков играют остатки серосодержащих и ароматических аминокислот (особенно триптофана и тирозина). Причем при действии солнечного ультрафиолета ( $\lambda > 285$  нм) поглощение осуществляется в основном триптофаном и тирозином. В более коротковолновой области спектра резко возрастает роль фотолиза цистина (см. табл. 5.1).

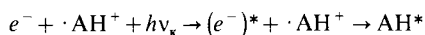
### 5.3. Природа первичных фотопродуктов ароматических аминокислот

Под действием ультрафиолета происходит фотоионизация триптофана, тирозина и фенилаланина с образованием сольватированного электрона и катион-радикала:

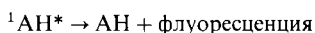


Появление сольватированного электрона можно зарегистрировать, если проводить ультрафиолетовое облучение замороженного образца тирозина или триптофана при температуре жидкого азота. Если использовать растворители, образующие при этой температуре стеклообразную массу, то можно видеть, как по мере облучения происходит появление фиолетовой окраски образца, которая обусловлена поглощением сольватированного электрона с максимумом в области 600 нм. Сольватированный электрон может быть обнаружен также методом ЭПР.

При освещении такой системы красным светом, поглощаемым сольватированным электроном, происходит обратная фотохимическая реакция перехода сольватированного электрона и катион-радикала в исходную аминокислоту:



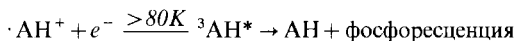
При этом часть молекул аминокислоты оказывается в возбужденном состоянии, поэтому при красном освещении можно наблюдать синюю фосфоресценцию и ультрафиолетовую флуоресценцию исходной аминокислоты (см. гл. 9):



Это явление было названо индуцированной светом люминесценцией.

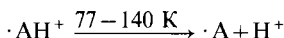


Рекомбинация сольватированного электрона и катион-радикала может идти также за счет термической активации выхода электрона из ловушки с образованием возбужденного (триплетного) состояния исходной аминокислоты. В результате наблюдается рекомбинационное свечение, активируемое при нагревании (*термолюминесценция*):

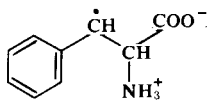


Если бы все первичные фотопродукты всегда рекомбинировали, то никакого необратимого фотохимического превращения аминокислот не происходило бы. Однако это не так. И сольватированный электрон, и катион-радикал могут вступать в дальнейшие превращения.

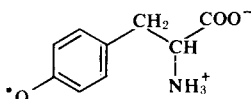
Катион-радикал — сильная кислота и при 77—140 К диссоциирует на протон и нейтральный радикал:



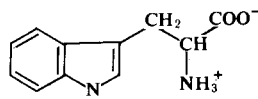
Анализ спектров люминесценции и возбуждения позволяет предложить структуру нейтральных радикалов ароматических аминокислот (Д. И. Рошупкин):



Радикал фенилаланина

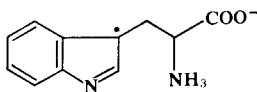


Радикал тирозина



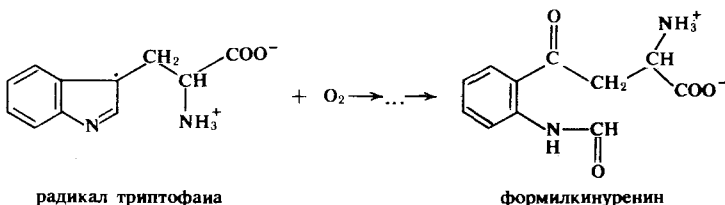
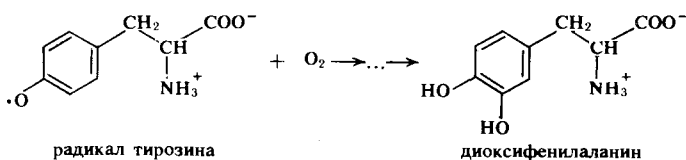
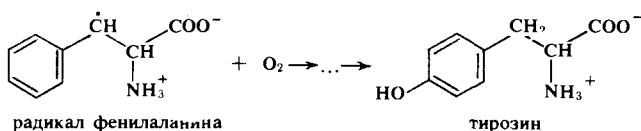
Радикал триптофана

Дальнейшее изучение спектров ЭПР облученных образцов триптофана показало, что в отличие от тирозина и фенилаланина указанный радикал триптофана немедленно вступает в процесс перегруппировки и стабильной оказывается структура с неспаренным электроном на 3-углеродном атоме индольного кольца:

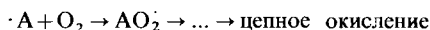


Нейтральные радикалы — неустойчивые соединения и при температуре выше 160—200 К вступают в дальнейшие превращения. Было показано, что реакции аминокислотного остатка могут быть при этом двух типов — с участием кислорода и без него.

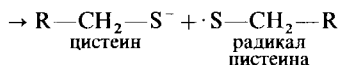
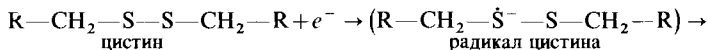
В присутствии кислорода происходит фотоокисление фенилаланина, триптофана и тирозина, вероятно, по следующему механизму:



Последовательность химических реакций между нейтральными радикалами и конечными продуктами детально еще не изучена. Исследование хемилюминесценции в растворах аминокислот, облученных в присутствии кислорода, показывает, что процесс протекает через стадию образования пероксидных продуктов



Большое значение в фотохимии белков имеют фотосенсибилизированные реакции с участием сольватированного электрона. Наибольшим сродством к электрону обладают цистеин и цистин. Согласно данным Л. Гроссвайнера и сотр. (1970) они быстро разрушаются в результате взаимодействия с сольватированными электронами, выбитыми из ароматического кольца:



Радикалы цистина могут рекомбинировать, образуя цистин

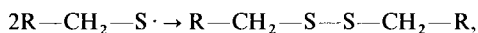


Таблица 5.2. Квантовые выходы  $\Phi$  фотолиза аминокислот и аминокислотных остатков

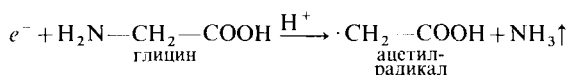
Объект исследования	Значения $\Phi$ для			$\lambda$ , нм
	триптофана	цистина	тирозина	
Свободная аминокислота в растворе (на воздухе)	0,05	0,11	270--310	
			254	
			280	
Трипсин, рН 3,0	0,010	0,45	280	
	0,047		0,026	
	0,047		0,026	
Лизоцим рН 4,5	0,040	0,580	0,023	254
Инсулин, рН 3,2		0,180	0,021	254
Глицилтриптофан, рН 4,5	0,043			280

а в присутствии кислорода они могут вступить с ним во взаимодействие, что приводит к появлению продуктов типа цистеин-сульфоновой кислоты:

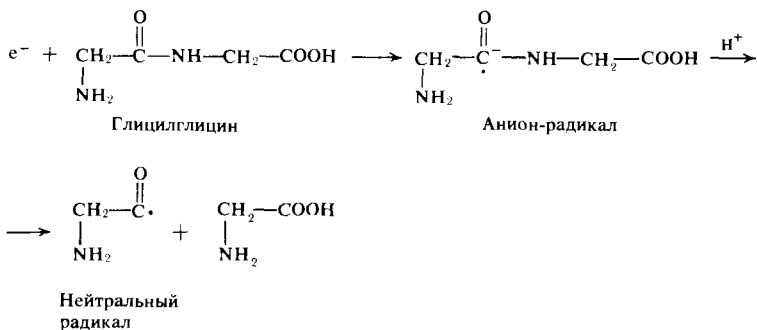


Подобная схема реакций подтверждается данными по изучению фотолиза дисульфидных связей в белках и по данным исследований спектров ЭПР смешанных растворов цистина и триптофана (О. А. Азизова, Л. П. Каюшин, 1972). Так, при определении квантового выхода фотолиза дисульфидных связей в трипсине под действием света различных длин волн (табл. 5.2) было обнаружено, что разрушение дисульфидных групп происходит не только под действием света, поглощаемого самим цистином (254 нм), но и под действием фотонов, поглощенных триптофаном (280 или 289 нм) (Л. Оженстин и др., 1968; Ю. А. Владимиров и др., 1968).

С меньшей эффективностью происходит разрушение алифатических аминокислот, сопровождающееся выделением аммиака, что свидетельствует о дезаминировании:

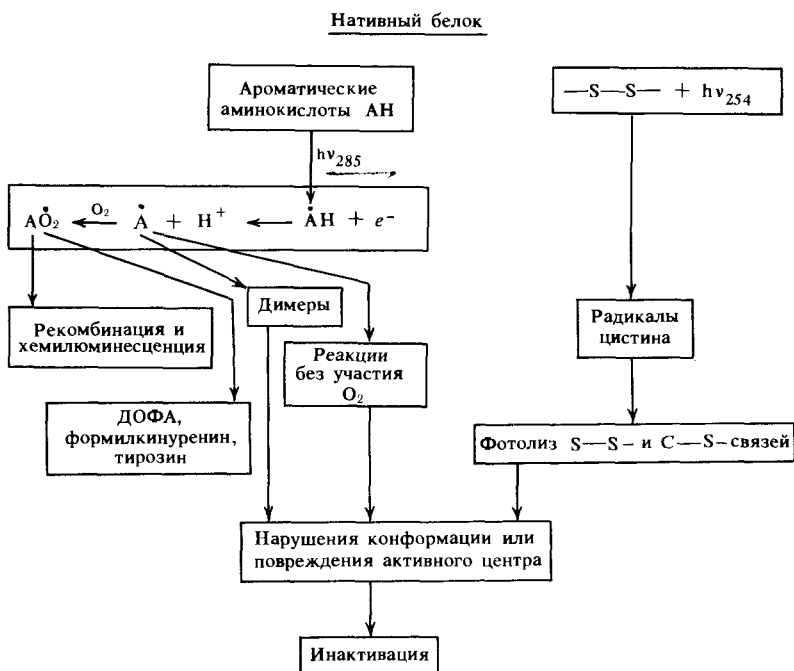


В присутствии алифатических дипептидов, например глицил-глицина, фотоионизация ароматических аминокислот приводит к появлению анион-радикала пептидной группы, и дальнейшие превращения этого радикала могут заканчиваться диссоциацией пептидной связи в соответствии со следующей схемой:



Приведем общую схему 1 процессов при УФ-облучении белка.

Схема 1. Фотохимические превращения в белках



#### 5.4. Действие ультрафиолета на биологические мембраны

Биологические мембраны выполняют в клетке барьерную функцию, основанную на их низкой проницаемости для полярных молекул и ионов. Ультрафиолетовое облучение приводит к увеличению проницаемости мембран для различных веществ и прежде всего для ионов. Изменение ионной проницаемости клеточных мембран было обнаружено у дрожжей,

яиц морского ежа, водорослей, простейших и т. д. Эти эффекты не были связаны с повреждением нуклеиновых кислот или ферментов, так как клетки в ряде случаев не теряли способность к размножению, а обмен веществ в них изменялся незначительно. Изменение проницаемости мембран для ионов натрия и калия было обнаружено при УФ-облучении безъядерных клеток, таких, как эритроциты человека. При этом наблюдался выход калия из клетки, вход в нее натрия и как следствие нарушения осмотического баланса — набухание и лизис эритроцитов (Дж. С. Кук, 1965). Увеличение проницаемости наблюдалось также и в случае мембран субклеточных структур, например митохондрий и лизосом.

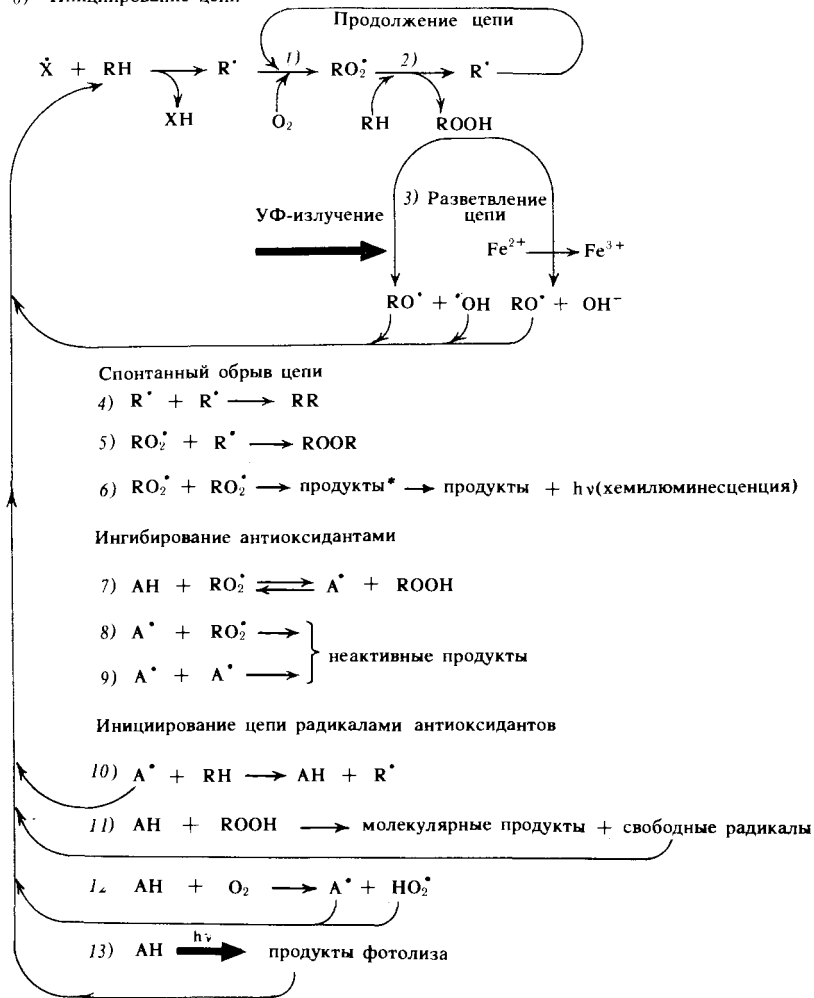
Из компонентов мембран наиболее выраженной чувствительностью к УФ-облучению обладают ненасыщенные жирные кислоты: олеиновая, линолевая, линоленовая, арахидоновая, а также соответствующие жирнокислотные остатки в фосфолипидах, из которых сформированы биологические мембраны. Молекулы этих ненасыщенных жирных кислот содержат соответственно одну, две, три и четыре двойные связи — $\text{C}=\text{C}$ —, разделенные метиленовыми мостиками — $\text{CH}_2$ —, т. е. двойные связи всегда не сопряжены. Максимумы спектров поглощения ненасыщенных жирных кислот располагаются в области  $\lambda < 220$  нм (см. разд. 1.3). Так как в фотохимии обычно используют свет с длинами волн более 240 нм, прямые фотохимические превращения неокисленных жирных кислот происходить не могут. Фотопревращения липидов являются всегда сенсibilизированными (см. гл. 6). Особенность ненасыщенных жирных кислот заключается в их легкой окисляемости кислородом воздуха, который присоединяется к углеродному атому, соседнему с двойной связью, например к углероду метиленового мостика. Этот процесс сопровождается образованием пероксидных продуктов и является цепной реакцией, запуск (иницирование) которой происходит с появлением в системе свободных радикалов. В цепных реакциях свободные радикалы, реагируя с другими молекулами, не исчезают, а превращаются в новые свободные радикалы.

Приведем схему 2 свободнорадикальных реакций окисления ненасыщенных липидов.

Свободнорадикальное окисление липидов начинается с реакции инициирования 0. Инициаторами могут служить свободные радикалы аминокислот, радикалы воды и др. Затем идут реакции продолжения цепи 1 и 2. Далее следуют реакции разветвления 3, когда гидропероксиды разлагаются, инициируя новые цепи. Разветвление происходит в присутствии ионов двухвалентного железа, под действием УФ-облучения или, значительно реже, спонтанно:

## Схема 2. Цепное свободнорадикальное окисление ненасыщенных липидов

0) Инициирование цепи



Не все радикалы  $RO_2\cdot$  и  $R\cdot$  продолжают цепь, часть их рекомбинируют друг с другом, давая неактивные продукты 4, 5 и 6. Помимо реакций спонтанного обрыва цепей, цепи могут прерываться антиоксидантами. Самым распространенным из них является витамин Е (токоферол), который при этом образует малоактивные радикалы. Наиболее активен витамин Е в относительно низких концентрациях (*in vitro*  $\sim 10^{-6} M$ ), когда невелика роль реакций 10—12. Витамин Е имеет максимум поглощения  $\sim 292$  нм и при УФ-облучении легко фотолизуется (13). В

отсутствие антиоксиданта реакции 7 и 8 осуществляться не могут и пероксидное окисление активизируется. Реакция 6 приводит к образованию продуктов в электронно-возбужденном состоянии и сопровождается испусканием квантов света (хемилюминесценцией). Хемилюминесцентный метод исследования находит применение в диагностике и для других целей (см. гл. 9).

Из схемы 2 следует, что хотя фотолиз липидов в целом нуждается в участии кислорода, но в нем все же есть стадии, в которых непосредственно присоединения кислорода не происходит, например реакция 3.

На ценной характер фотолиза липидов указывают следующие факты. Во-первых, высокие значения квантовых выходов. Так, например, квантовый выход фотохимического образования пероксидов этиллинолеата равен  $\sim 90$ . Во-вторых, наблюдается сильно выраженное фотохимическое последствие. Потребление кислорода прекращается не в момент выключения света, а продолжается еще несколько минут или даже часов в темноте.

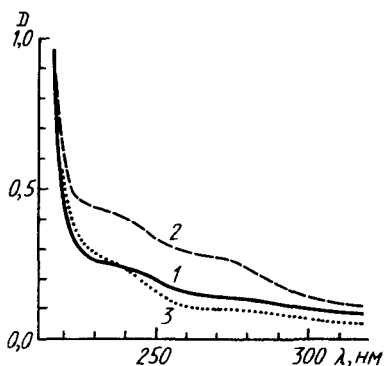


Рис. 5.5. Фотолиз ( $\lambda > 239$  нм) липидов из мозга крыс:

1 — необлученные липиды в гептане; 2 — УФ-облучение на воздухе; 3 — УФ-облучение в отсутствие кислорода

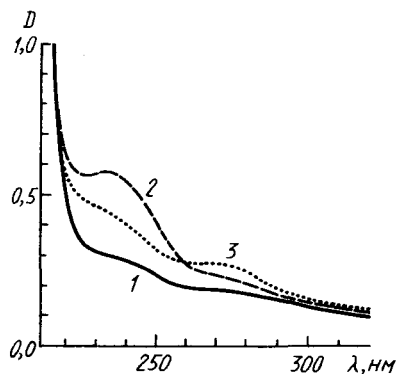


Рис. 5.6. Фотолиз липидов из мозга крыс в гептане:

1 — необлученные липиды; 2 — УФ-облучение ( $\lambda > 300$  нм) на воздухе; 3 — вторая проба облучена ( $\lambda > 239$  нм) без кислорода

Ненасыщенная жирная кислота (поглощение при  $\lambda < 220$  нм)

сенсбилизатор,  
УФ-облучение,  
кислород.

(стадия 1)

↓  
Гидропероксиды (поглощение при 233 нм)

УФ-облучение  
в вакууме

(стадия 2)

↓  
Альдегиды и кетоны (поглощение  $\sim 260-280$  нм)

Фотосенсибилизаторами окисления могут служить не только хромофорные группировки белков и других эндогенных и экзогенных соединений, но также и продукты собственного окисления ненасыщенных липидов. При окислении полиненасыщенных жирных кислот формирование гидропероксидов сопровождается появлением конъюгированных систем двойных связей — диеновых (максимум поглощения при  $\lambda = 233$  нм), триеновых ( $\lambda \sim 260-280$  нм) и других конъюгатов. Кроме того, разрушение пероксидных продуктов приводит к появлению кетонов и альдегидов, поглощающих  $\sim 270$  нм. Наиболее известен малоновый диальдегид, способный давать окрашенный хромофор ( $\lambda = 533$  нм) с тиобарбитуровой кислотой. Есть также другие продукты, имеющие хвост поглощения в видимой области и сообщающие окисленным липидам желтоватую окраску.

Если облучать раствор липидов интегральным светом ртутно - кварцевой лампы высокого давления ( $\lambda > 239$  нм), то спектрофотометрически можно обнаружить все перечисленные хромофорные группы продуктов окисления

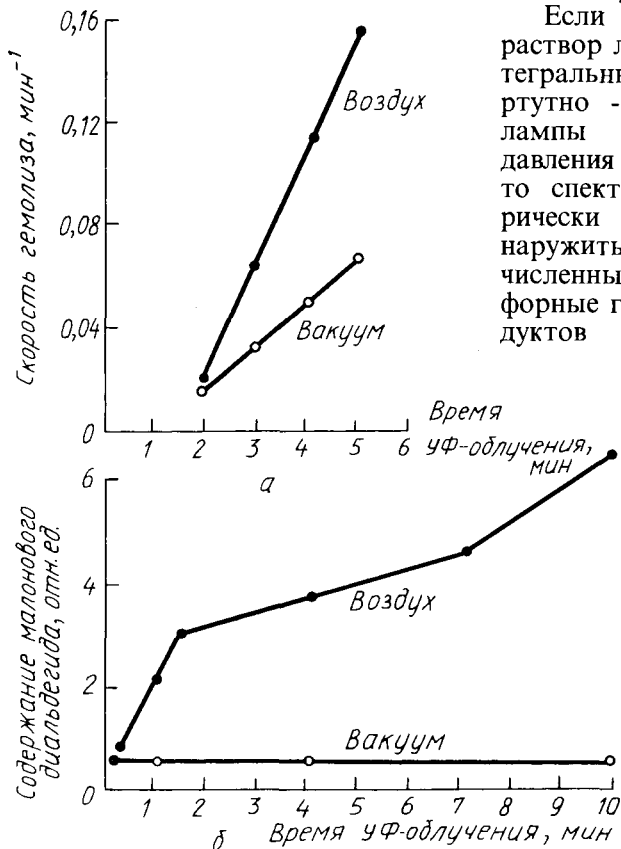


Рис. 5.7. Дозовая кривая УФ-повреждения ( $\lambda > 239$  нм) эритроцитов на воздухе и в вакууме: а — гемолиз; б — накопление продуктов окисления липидов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой



липидов (рис. 5.5). Используя длинноволновое УФ-облучение ( $\lambda > 300$  нм), в присутствии кислорода удается накопить преимущественно диеновые конъюгаты (рис. 5.6, кривая 2). Прямой фотолиз диеновых конъюгатов облучением при  $\lambda \sim 240$  нм не нуждается в присутствии кислорода, при этом формируются более длинноволновые продукты — альдегиды и кетоны (рис. 5.6, кривая 3). Таким образом, используя различные условия облучения, удастся избирательно накапливать те или иные продукты окисления липидов.

Разумеется, если кислорода не было с самого начала облучения, продукты пероксидного окисления липидов накапливаться

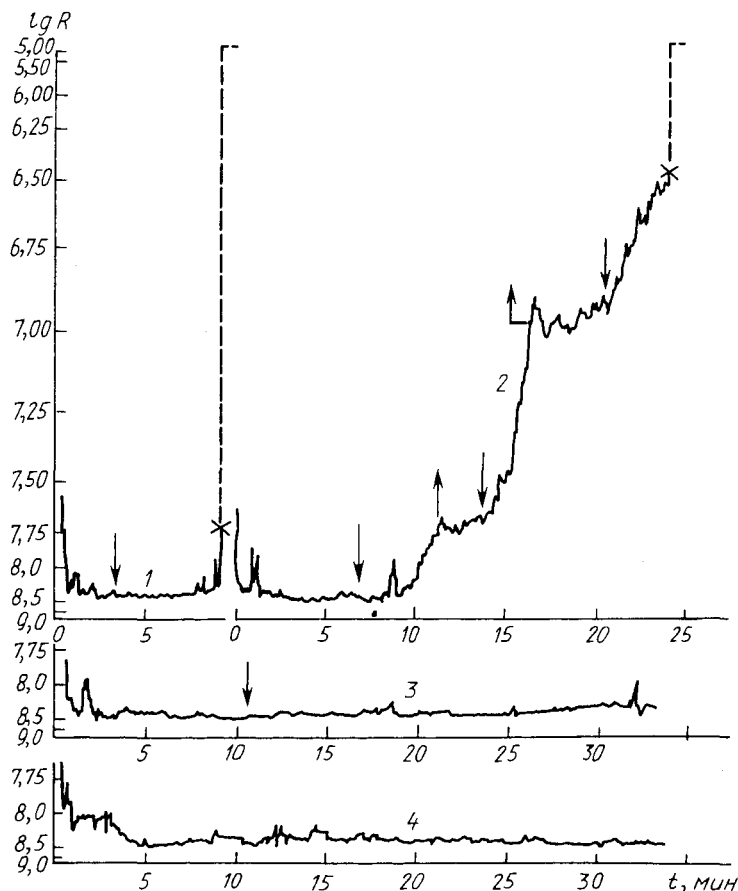


Рис. 5.8. Индуцированное ультрафиолетом ( $\lambda > 239$  нм) увеличение электропроводности бимолекулярных липидных мембран, сформированных из липидов мозга крыс:

1, 2 — УФ-облучение на воздухе; 3 — УФ-облучение в отсутствие кислорода; 4 — без облучения;  $R$  — электрическое сопротивление мембран

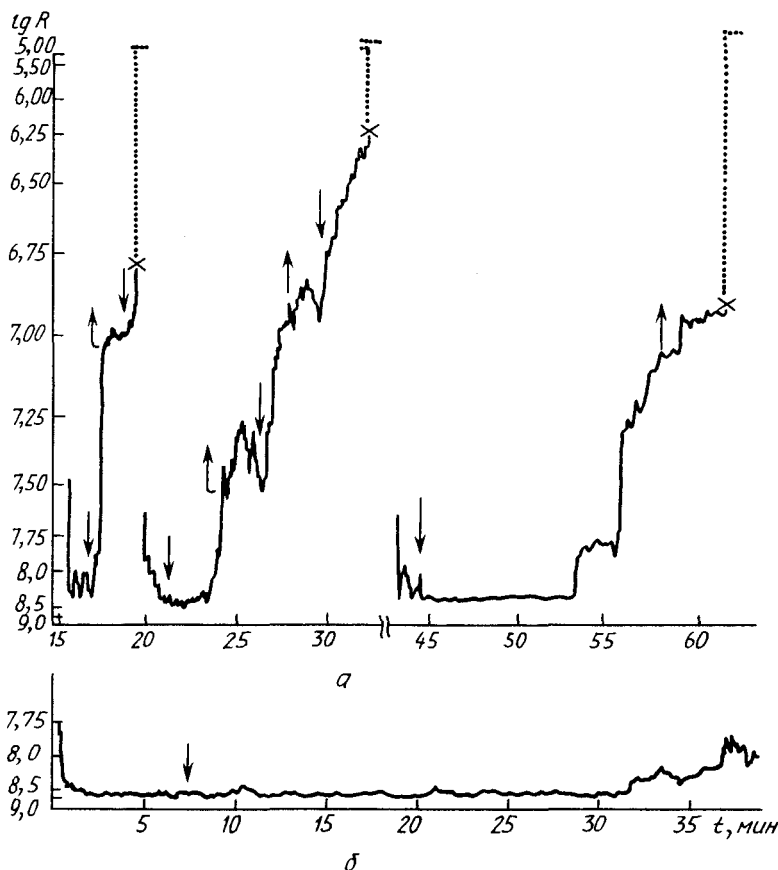


Рис. 5.9. Увеличение проницаемости БЛМ происходит в результате фотолиза гидропероксидов, содержащихся в мембране:

*а*—раствор липидов в гептане УФ-облучен ( $\lambda > 300$  нм) на воздухе; на оси абсцисс— время, прошедшее после УФ-облучения раствора липидов; БЛМ сформированы из фотоокисленных липидов и затем УФ-облучены ( $\lambda > 240$  нм) в отсутствие кислорода; *б*—БЛМ сформированы из необлученных липидов и затем облучены ( $\lambda > 240$  нм) в отсутствие кислорода

не будут. В этом отношении процесс действия ультрафиолета на липиды принципиально отличается от действия этого облучения на белки и нуклеиновые кислоты, фотоинактивация которых мало или совсем не зависит от наличия кислорода в растворе.

При ультрафиолетовом облучении биологических мембран в них происходит одновременно много фотохимических реакций: фотоинактивация белков в результате фотолиза ароматических аминокислот и серосодержащих групп, пероксидное окисление липидов, фотодеструкция различных коферментов, таких, как пиридиннуклеотиды, флавины, кофермент Q, геминовые соедине-

ния, которые связаны с энзиматическими системами, встроенными в мембраны. Рано или поздно фотохимические реакции с участием любого из этих хромофоров должны отразиться на функционировании мембраны. Наиболее раннее проявление действия УФ-облучения — это увеличение ионной проницаемости мембраны. Какие же фотохимические реакции ответственны именно за это изменение в мембранных структурах? Основным предметом дискуссии является вопрос об относительном вкладе денатурации белков и фотохимического окисления липидов. Эти два типа реакций различаются по нескольким параметрам и, прежде всего, по зависимости процесса от кислорода и антиоксидантов, т. е. веществ, специфически тормозящих пероксидное окисление липидов за счет взаимодействия со свободными радикалами (см. схему 2). Ультрафиолетовое поражение белков мало зависит от кислорода и не предотвращается антиоксидантами, а пероксидное окисление липидов при УФ-облучении, напротив, протекает только в присутствии кислорода и тормозится антиоксидантами. В то же время исследования показали, что кислород резко усиливает УФ-повреждение митохондрий, а также выход ионов из эритроцитов и их гемолиз при УФ-облучении (рис. 5.7). Добавление токоферола к эритроцитам тормозит пероксидное окисление липидов и задерживает УФ-гемолиз. Эти факты свидетельствуют о том, что действие УФ-облучения на биологические мембраны связано с пероксидным окислением ненасыщенных жирных кислот. По-видимому, вклад фотоокисления липидов особенно велик при больших дозах УФ-облучения. При малых дозах кислородный эффект выражен слабее (см. рис. 5.7).

Фотоокисление ненасыщенных жирных кислот ответственно за увеличение ионной проницаемости липидного бислоя биомембран. Д. И. Рощупкиным и авторами данной книги (1972) было обнаружено, что УФ-облучение искусственных бимолекулярных липидных мембран (БЛМ) приводит к резкому падению их электрического сопротивления (рис. 5.8) за счет избирательного увеличения проницаемости для протонов. Этот процесс полностью зависит от присутствия кислорода. Однако непо-

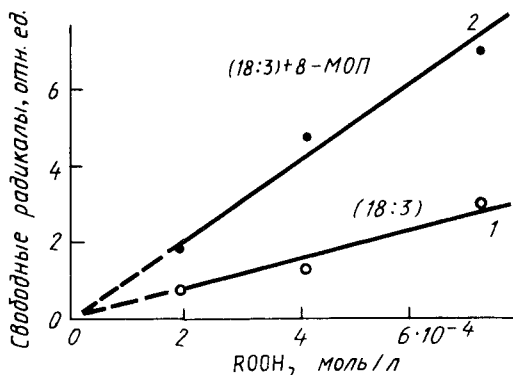
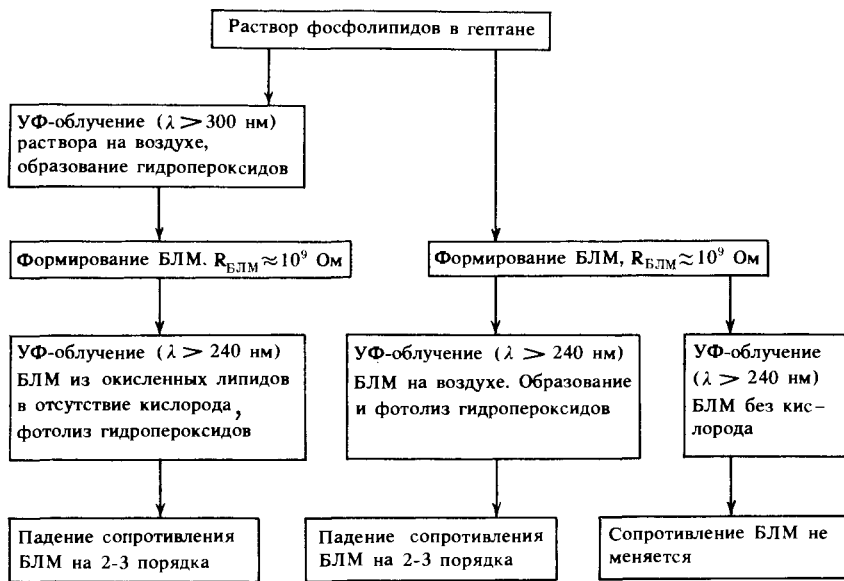


Рис. 5.10. Влияние степени окисленности линоленовой кислоты на фотоиндуцированное ( $\lambda > 320$  нм, 77 К) образование свободных радикалов в отсутствие (1) и в присутствии (2) сенсibilизатора 8-МОП: по оси абсцисс — содержание гидропероксидов в растворе линоленовой кислоты (0,1 М) в гексане (В. Б. Гаврилов и согр., 1982)

средственно увеличение проницаемости было связано не с образованием гидропероксидов, а с их фотолизом до альдегидов и кетонов, не нуждающихся в кислороде. Это было обнаружено в опыте (рис. 5.9), проведенном по следующей схеме:



По-видимому, накопление продуктов окисления липидов может увеличивать эффективность пероксидного фотоокисления липидов, сенсibilизированного не только этими продуктами, но и экзогенными сенсibilизаторами. Так, методом ЭПР было показано, что при УФ-облучении (366 нм) выход свободных радикалов линоленовой кислоты (раствор в гексане, 77 К) линейно возрастал с ростом концентрации гидропероксидов в препарате. Выход свободных радикалов в присутствии фотосенсibilизатора 8-метоксиборалена (8-МОП) был в 2—3 раза выше, чем без него, и также линейно зависел от содержания в образце гидропероксидов (рис. 5.10).

## ГЛАВА 6

### МЕХАНИЗМ ФОТОСЕНСИБИЛИЗИРОВАННЫХ РЕАКЦИЙ В БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ

Биологические объекты обладают чувствительностью к свету за счет наличия эндогенных хромофоров. Фотобиологические процессы — зрение, фотомутагенез, фотоканцерогенез, эритема и др. — индуцируются, если под действием света соответствующих длин волн возбуждаются молекулы зрительных пигментов, бел-

ков, нуклеиновых кислот или других нормально содержащихся в объекте хромофоров. В некоторых случаях наблюдается резкое повышение светочувствительности биологических систем. Чаще всего это происходит при попадании в объект экзогенных хромофоров, например каких-либо красителей, поглощающих видимый или УФ-свет. Иногда фоточувствительность возрастает при заболеваниях. Например, в тканях человека при нарушениях эритропоэза или отравлениях свинцом резко повышается содержание протопорфинов, и фотохимические реакции с их участием начинают играть более заметную роль по сравнению с нормой.

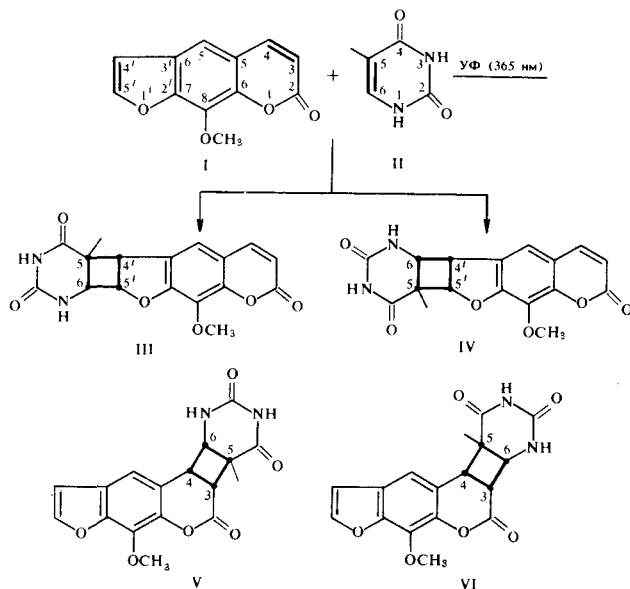
В фотобиологии соединения, повышающие чувствительность биообъектов к свету, называют *фотосенсибилизаторами*. Механизмы фотохимических реакций фотосенсибилизаторов крайне многообразны, так же как и механизмы действия эндогенных хромофоров. Практически удобно фотосенсибилизированные процессы разделить на два типа: нуждающиеся в присутствии кислорода и не нуждающиеся в нем. Фотобиологические эффекты, для осуществления которых требуется участие трех составляющих — света, кислорода и красителя — принято называть *фотодинамическими эффектами*, а соответствующие красители — *фотодинамическими красителями*.

### **6.1. Фотосенсибилизированные реакции, не нуждающиеся в кислороде**

Один из примеров таких реакций уже был подробно рассмотрен в разделе 5.3: фотолиз цистина в макромолекулах белков при действии УФ-излучения с длинами волн более 280 нм. Собственное поглощение цистина здесь очень мало и не может объяснить высокую эффективность фотолиза. Фотосенсибилизаторами этого процесса служат ароматические аминокислоты триптофан и тирозин. Возбужденные молекулы ароматических аминокислот ионизируются, генерируя  $e^-$ . Цистин захватывает  $e^-$ , образуя анион-радикалы цистина, последние распадаются преимущественно по связи между атомами серы. Разрыв дисульфидных мостиков — одна из наиболее существенных реакций, ответственных за утрату ферментативной активности.

Другим примером кислород-независимых фотосенсибилизированных реакций является фотоприсоединение псораленов (фурокумаринов) к пиримидиновым основаниям ДНК, обнаруженное Л. Мюсайо и Дж. Родигеро. Эти реакции играют ключевую роль в некоторых процессах, фотосенсибилизированных псораленами. Установлено, что они ответственны за летальные и мутагенные эффекты у микроорганизмов, а также лежат в основе терапевтических эффектов при фотохимиотерапии псориаза и других заболеваниях кожи (см. гл. 7). Совместное воздействие псораленов и УФ-А-излучения называют ПУФА-терапией.

Рассмотрим сначала реакции псораленов с тимином в растворе. Псоралены имеют широкую длинноволновую полосу поглощения с максимумом  $\sim 300$  нм, простирающуюся до 400 нм. При действии ближнего ультрафиолета (УФ-А, 320—400 нм), не поглощаемого тимином, псорален возбуждается и вступает в реакцию присоединения, образуя с тимином несколько циклобутановых аддуктов



У молекул I и II жирно нарисованы реакционноспособные двойные связи. В жидких растворах образуются не все изображенные аддукты, а только типов V и VI. Их появление ингибируется тушителями триплетных состояний— парамагнитными ионами и кислородом. Время жизни триплетных молекул псораленов в жидких растворах в  $\sim 1000$  раз больше, чем возбужденных синглетных. Естественно, что в контролируемых диффузией жидкофазных реакциях у триплетных молекул больше шансов прореагировать с партнером. Возникновение соединений V и VI включает свободнорадикальную стадию, так как ингибируется ловушками свободных радикалов ( $\alpha$ -токоферолом) и ловушками сольватированного электрона ( $\text{KNO}_3$  и цистеином).

Если заморозить раствор тимина и псоралена, то в твердой матрице уже образуются четыре типа аддуктов, включая III и IV. Согласно теоретическим расчетам П.-С. Сонга, триплетное состояние в возбужденных молекулах псораленов локализуется в области 3,4-двойной связи, а 4', 5'-связь вступает в реакции из синглетных возбужденных состояний. По-видимому, в твердых растворах, где диффузия невозможна, в реакцию вступают лишь соседние

молекулы. При этом в зависимости от пространственного расположения партнеров молекулы псораленов могут реагировать как из  $T_1$ -, так и из  $S_1$ -состояний. Твердофазная реакция включает свободнорадикальную стадию: об этом свидетельствуют данные, полученные методом ЭПР, согласно которым УФ-А-облучение замороженных (77 К) растворов псораленов и тимина приводит к появлению водородных аддуктов у  $C_6$ -атома тимина.

Рассмотрим фотоприсоединение псораленов к тимину, входящему в состав двуспиральной ДНК. В этом случае фотохимической реакции всегда предшествует темновая стадия связывания псораленов с ДНК. Плоские молекулы псораленов в темноте интеркалируют в двойную спираль и располагаются между двумя парами комплементарных оснований. Если рядом с псораленом оказался тимин, то реакционноспособные участки молекул псоралена локализируются близко к реакционноспособной связи тимина. Поглотив фотон, молекула псоралена не должна теперь в процессе диффузии «искать» тимин. Таким путем в водных растворах ДНК образуются все четыре типа аддуктов псорален-тимин. Спектральные свойства соединений *III, IV* отличаются от свойств *V, VI* (рис. 6.1): *III* и *IV* имеют максимумы поглощения  $\sim 330$  нм и флуоресцируют, тогда как *V* и *VI* вообще не поглощают в УФ-А-области спектра и не флуоресцируют. Поэтому их дальнейшая фотохимическая судьба различается. Соединения *III* или *IV* способны, поглотив фотон УФ-А, вступить в реакцию фотоприсоединения еще с одним тиминном из другой нити ДНК, если такой тимин рядом имеется. Таким образом, после последовательного поглощения двух квантов молекула псоралена может ковалентно связать между собой две нити ДНК.

Квантовый выход фотоприсоединения интеркалированных молекул псоралена значительно выше, чем свободных псораленов к тимину в растворе. Поэтому вкладом фотохимических реакций свободных молекул псоралена с ДНК можно пренебречь. Ф. Далл, Акуа и сотр. предлагают следующую схему реакций фотоприсоединения:

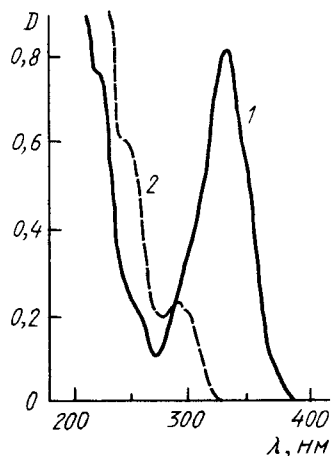
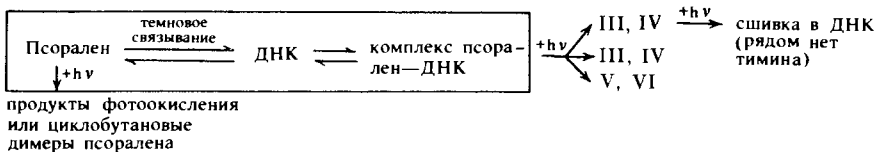
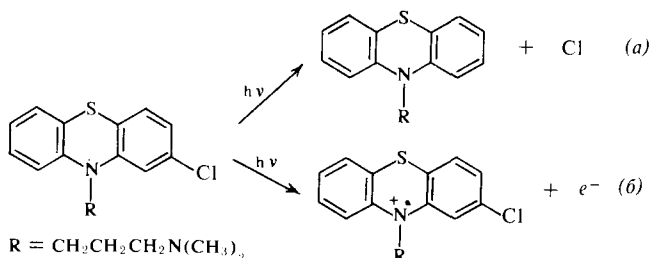


Рис. 6.1. Спектры поглощения циклобутановых аддуктов псорален-тимин: 1 — моноаддукты *III, IV*; 2 — моноаддукты *V, VI*

Фотопродукты взаимодействия псоралена и тимина, содержащие 1 молекулу тимина, называют *моноаддуктами*; а содержащие 2 молекулы тимина — *диаддуктами* (сшивками в ДНК). Г. Б. Завильгельским и другими показано, что возникновение диаддуктов — главная причина ранее известного летального действия УФ-облучения на микроорганизмы в присутствии псоралена, тогда как моноаддукты в большей степени ответственны за мутагенные действия облучения. Моноаддукты репарируются клетками легче, чем сшивки. Если доза ПУФА-воздействия велика или репарирующие системы клетки неполноценны, то клетки гибнут в результате возникновения даже малого числа аддуктов. Исходя из рассмотренного, Дж. Е. Херст предложил использовать ПУФА-воздействие для производства вакцин. Обычно вакцины готовят из патогенных микробных клеток путем кипячения или воздействия на них разных химических агентов. При этом нарушается антигенная структура и эффективность вакцин оказывается из-за этого резко сниженной. При больших дозах ПУФА-воздействия бактериальные клетки не в состоянии репарировать многочисленные повреждения ДНК и теряют способность размножаться, тогда как их антигенные структуры остаются практически неповрежденными.

Примером фотосенсибилизированных реакций без участия кислорода могут служить также некоторые фотореакции хлорпромазина. Хлорпромазин используют для лечения психических заболеваний. Побочным эффектом терапии оказалось повышение чувствительности кожи пациентов к свету. Максимум спектра поглощения хлорпромазина в водных растворах расположен при 305 нм, хвост поглощения простирается в УФ-А-область спектра. Электронно-возбужденный хлорпромазин характеризуется высоким выходом триплетных состояний. Первичные фотопродукты в реакциях хлорпромазина — нейтральные свободные радикалы (а) или катион-радикалы и сольватированный электрон (б):



Эти нестабильные реакционноспособные фотопродукты могут реагировать с биомолекулами. Хлорпромазин с высокой эффективностью фотоприсоединяется к белкам через стадию образования нейтральных радикалов. Эта реакция лежит в основе фотоинактивации бактериофагов; меньшая роль в этом процессе



принадлежит реакциям фотоприсоединения хлорпромазина к ДНК и РНК. Напротив, фотомутагенные эффекты хлорпромазина основаны главным образом на его реакциях с ДНК. Фотоионизация хлорпромазина идет эффективнее в неводной среде. Поэтому УФ-А-облучение хлорпромазина, образовавшего комплексы с ДНК, способствует фотогенерации сольватированных электронов, последние вызывают расщепление нитей ДНК.

Хлорпромазин фотосенсибилизирует гемолиз эритроцитов, этот процесс идет и в отсутствие кислорода; подавляющее большинство других фотосенсибилизаторов повреждают мембраны по фотодинамическому механизму. При облучении раствора хлорпромазина в отсутствие кислорода образуются стабильные фотопродукты, которые при добавлении к эритроцитам вызывают лизис клеток, действуя подобно детергентам. Эти же фотопродукты токсичны для макрофагов, при введении в кожу млекопитающих вызывают заметную реакцию, способны ковалентно связываться с ДНК.

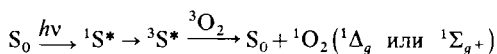
## 6.2. Фотодинамические эффекты с участием синглетного кислорода

Кислороднезависимых фотосенсиблизованных реакций известно сравнительно мало, хотя они участвуют в важных процессах. Основная часть изученных фотосенсиблизованных процессов нуждается в присутствии кислорода.

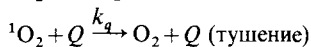
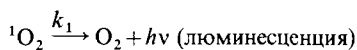
Как правило, в фотоокислительных реакциях участвуют триплетные состояния сенсibilизаторов. Молекулы в триплетном состоянии или другие короткоживущие интермедиаты могут химически взаимодействовать с молекулами субстрата в реакциях переноса водорода или электрона. При переносе электрона на кислород образуется супероксид-радикал  $O_2^-$ . При переносе электрона или атома водорода на другие субстраты кислород взаимодействует с короткоживущими промежуточными соединениями, образуя продукты фотоокисления. Другой путь фотоокислительных реакций косвенный — молекула сенсibilизатора в триплетном состоянии химически не участвует в реакции, а передает энергию возбуждения на молекулярный кислород, образуя электронно-возбужденный (синглетный) кислород  $^1O_2$ . Активность  $^1O_2$  в окислительных реакциях в  $\sim 100$  раз выше, чем невозбужденного кислорода. Фотопроцессы с участием  $^1O_2$  настолько распространены, что их часто выделяют в особый тип реакций, называемый *фотореакциями типа II*. Все остальные реакции по этой классификации (включая как окислительные, так и не нуждающиеся в кислороде) относят к *типу I*.

Схема фотореакций типа II следующая. Сенсibilизатор  $S_0$  поглощает квант света и переходит в синглетное возбужденное состояние  $^1S^*$ . В результате интеркомбинационной конверсии образуется триплетное состояние сенсibilизатора  $^3S^*$ , способного

взаимодействовать с невозбужденным кислородом  $^3\text{O}_2$  и передавать ему энергию с образованием электронно-возбужденного синглетного кислорода  $^1\text{O}_2$ :

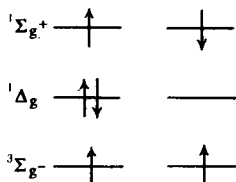


Синглетный кислород переходит в основное состояние либо с высвечиванием кванта люминесценции, либо безызлучательным путем; последнее связано с тушением люминесценции посторонними молекулами:



Первые данные об образовании синглетного кислорода сенсибилизаторами и его участии в фотохимических реакциях были получены Х. Каутским (1931). Однако широкое признание эти работы получили только в 60-е годы.

Основное состояние кислорода — триплетное, он имеет два неспаренных электрона, находящихся на разных орбиталях. Электроны локализованы преимущественно так, что каждый из них находится на одном из двух ядер. В спектроскопии это состояние обозначается  $^3\Sigma_g^-$ . В химических уравнениях пишут  $^3\text{O}_2$  или просто  $\text{O}_2$ . Электронно-возбужденные состояния кислорода — синглетные и обозначаются  $^1\Delta_g$  и  $^1\Sigma_g^+$  (или просто  $^1\text{O}_2$ ):

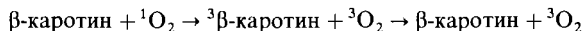


В состоянии  $^1\Sigma_g^+$  неспаренные электроны находятся на разных орбиталях и пространственно разделены. Полагают, что состояние  $^1\Sigma_g^+$ , так же, как и  $^3\Sigma_g^-$ , бирадикальное. В  $^1\Delta_g$  состоянии занята одна и та же орбиталь. Свойства синглетного кислорода в обоих состояниях различны. В газовой фазе (при низком давлении)  $^1\Delta_g$  живет чрезвычайно долго (излучательное  $\tau = 1/k_1 \approx 45$  мин).  $^1\Sigma_g^+$  имеет меньшее излучательное  $\tau$  ( $\sim 7$  с) и эффективно тушится парами воды. В растворах время жизни синглетного кислорода значительно меньше и сильно зависит от природы растворителя. Например,  $\tau$   $^1\text{O}_2$  ( $^1\Delta_g$ ) в воде равно  $\sim 4$  мкс, в  $\text{D}_2\text{O}$  — 67 мкс, в  $\text{CCl}_4$  — 28 мс. Важно, что  $^1\Sigma_g^+$  состояние эффективно тушится водой, в связи с этим его время жизни меньше  $10^{-10}$  с. Поэтому в реакциях, происходящих в водных растворах (как это имеет место в биологических системах), важен только  $^1\Delta_g$ , а  $^1\Sigma_g^+$  инактивируется, не успевая диффундировать к субстрату окисления. В газовой

фазе легко регистрируется люминесценция  ${}^1\text{O}_2$ , для  ${}^1\Sigma_g^+$  максимум расположен при 762 нм ( $157 \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$ ), а для  ${}^1\Delta_g$  — 1270 нм ( $95 \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$ ). Считают, что очень быстрая дезактивация  ${}^1\Sigma_g^+$  приводит к образованию  ${}^1\Delta_g$ . В растворах люминесценция  ${}^1\Sigma_g^+$  не обнаружена, а люминесценция  ${}^1\Delta_g$  измерена впервые А. А. Красновским (мл) (рис. 6.2). Измерение люминесценции  ${}^1\Delta_g$  в настоящее время является единственным прямым методом регистрации  ${}^1\text{O}_2$  в растворах. В литературе описано также много косвенных методов, хотя они и дают менее надежную информацию и допускают другие объяснения. Остановимся на главных из них.

Время жизни  ${}^1\text{O}_2$  ( ${}^1\Delta_g$ ) в воде в 16 раз меньше, чем в  $\text{D}_2\text{O}$  (4 и 67 мкс соответственно). Поэтому ускорение какой-либо фотохимической реакции в  $\text{D}_2\text{O}$  по сравнению с  $\text{H}_2\text{O}$  может в некоторых случаях указывать на участие  ${}^1\text{O}_2$ . Однако нужно всегда выяснять, как влияет  $\text{D}_2\text{O}$  на фотофизические свойства сенсibilизатора и на свободнорадикальные реакции с участием сенсibilизатора, а также знать, как  $\text{D}_2\text{O}$  влияет на свойства окисляемого субстрата. Например, С. В. Конев и сотр. обнаружили существенные изменения конформации белков в  $\text{D}_2\text{O}$  по сравнению с конформацией в  $\text{H}_2\text{O}$ . Известно также, что квантовый выход флуоресценции триптофана в  $\text{D}_2\text{O}$  в  $\sim 1,5$  раза выше, чем в  $\text{H}_2\text{O}$ .

Для выявления роли  ${}^1\text{O}_2$  в фотопроцессах часто используют физические тушители и химические ловушки  ${}^1\text{O}_2$ . Наиболее эффективно тушит  ${}^1\Delta_g$   $\beta$ -каротин, константа скорости тушения близка к диффузионной и равна  $3 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ :



$\beta$ -Каротин в процессе тушения претерпевает *цис-транс*-изомеризацию.

Наряду с тушением синглетного кислорода каротин может дезактивировать триплетные состояния сенсibilизатора, переводя его в основное состояние до того, как он успеет вступить в контакт с молекулами кислорода или претерпеть химическое превращение. Так, например, бескаротиноидные мутанты растений и фотосинтезирующих микроорганизмов быстро подвергаются фотоокислительной деструкции при участии  ${}^1\text{O}_2$ . Однако защитное

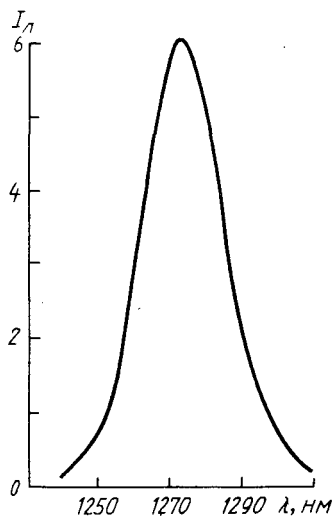


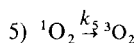
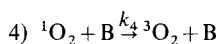
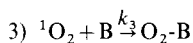
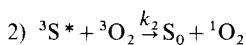
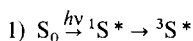
Рис. 6.2. Спектр люминесценции кислорода из  ${}^1\Delta_g$  состояния. Синглетный кислород генерирован псораленом ( $10^{-4} \text{ M}$ ) в  $\text{CCl}_4$  возбуждение при 340 нм

действие  $\beta$ -каротина в растениях на 90% обусловлено тушением триплетов хлорофилла, т. е.  $\beta$ -каротин не столько непосредственно тушит  $^1\text{O}_2$ , сколько предотвращает его фотогенерацию хлорофиллом.

Другим распространенным тушителем  $^1\text{O}_2$  является азид натрия ( $\text{NaN}_3$ ), однако тушение триплетов сенсibilизаторов азидом практически не изучалось. Дифенилизобензофуран часто используют как химическую ловушку  $^1\text{O}_2$ . Его окисление сопровождается уменьшением оптической плотности в УФ-области спектра, однако он сам легко подвергается фотохимическому распаду при облучении ближним ультрафиолетом. Пространственно-затрудненные пиперидины, реагируя с синглетным кислородом, образуют стабильные нитроксильные свободные радикалы, легко регистрируемые методом ЭПР в жидких растворах. Скорость образования радикалов пропорциональна скорости генерации  $^1\text{O}_2$ . Однако показано, что стабильные радикалы могут образовываться также и при взаимодействии пиперидинов с пероксидными и другими радикалами. Некоторые антиоксиданты, например  $\alpha$ -токоферол, являются хорошими тушителями  $^1\text{O}_2$  ( $k_q$  токоферола  $\sim 10^8$  л · моль $^{-1}$  · с $^{-1}$ ), но они же эффективно ингибируют цепные свободнорадикальные реакции.

Очевидно, что интерпретация данных по обнаружению синглетного кислорода косвенными методами должна быть осторожной. Всегда нужен тщательный анализ возможных артефактов.

Если имеются основания предположить участие синглетного кислорода в фотосенсибилизированной реакции, то можно уточнить значения констант скоростей отдельных стадий этих реакций путем анализа кинетики процесса. Последовательность реакций можно представить в следующем виде:



Синглетный кислород может взаимодействовать с субстратом В химически, окисляя его (реакция 3), или физически (4), а также  $^1\text{O}_2$  может спонтанно дезактивироваться (5). В стационарном режиме облучения концентрация  $^1\text{O}_2$  будет постоянна, т. е. скорость изменения концентрации  $^1\text{O}_2$  равна нулю:

$$\frac{d({}^1\text{O}_2)}{dt} = 0 = \Phi_{\Delta}(I_0 - I) - \{k_5 + (k_3 + k_4)[\text{B}]\} [{}^1\text{O}_2], \quad (6.1)$$

где  $\Phi_{\Delta}$  — квантовый выход генерации  ${}^1\text{O}_2$ ;  $(I_0 - I)$  — интенсивность поглощенного света (скорость поглощения);  $k_3$ ,  $k_4$  и  $k_5$  — константы скоростей химического и физического тушения  ${}^1\text{O}_2$  субстратом, а также спонтанной дезактивации  ${}^1\text{O}_2$ . Квантовый выход  $\Phi$  окисления субстрата равен с учетом уравнения (6.1)

$$\Phi = \frac{k_3[\text{B}][{}^1\text{O}_2]}{I_0 - I} = \frac{\Phi_{\Delta}k_3[\text{B}]}{k_5 + (k_3 + k_4)[\text{B}]}. \quad (6.2)$$

Видно, что  $\Phi$  зависит от концентрации субстрата и что эта зависимость — нелинейная. При построении графиков удобнее иметь дело с линейными функциями. Из уравнения 6.2 следует, что зависимость  $1/\Phi = f(1/[\text{B}])$  выражается прямой линией.

Преобразуем уравнение 6.2, введя две новые величины:  $\psi_{\infty} = k_3/(k_3 + k_4)$  и  $\beta = k_5/(k_3 + k_4)$ .  $\psi_{\infty}$  — доля химических реакций во всех актах тушения  ${}^1\text{O}_2$  субстратом, т. е. доля всего синглетного кислорода, фотогенерированного в системе, истраченная на химическое окисление при  $[\text{B}] \rightarrow \infty$ , когда скоростью реакции 5 — дезактивации  ${}^1\text{O}_2$  растворителем — можно пренебречь. Квантовый выход фотоокисления при бесконечно высокой концентрации субстрата  $\Phi_{\infty}$ , равный

$$\Phi_{\infty} = \Phi_{\Delta}\psi_{\infty}, \quad (6.3)$$

можно назвать предельным квантовым выходом данной фотосенсибилизированной реакции.

Параметр  $\beta$  численно равен концентрации субстрата, при которой скорость спонтанной дезактивации  ${}^1\text{O}_2$  растворителем (реакция 5) и скорость тушения  ${}^1\text{O}_2$  субстратом (реакции 3+4) равны. В итоге получаем

$$\frac{1}{\Phi} = \frac{\beta}{\Phi_{\infty}[\text{B}]} + \frac{1}{\Phi_{\infty}}. \quad (6.4)$$

На рис. 6.3 приводится зависимость квантового выхода фотосенсибилизированного метиленовым синим (МС) окисления ДОФА, приведенная в обратных координатах. По величине отсечки на оси абсцисс находят величину  $\beta$ , в данном случае она равна 3,3 мМ. По отсечке на оси ординат определяют  $\Phi_{\infty}$ , которая равна 0,048. Величина, обратная  $\beta$ , является мерой эффективности взаимодействия  ${}^1\text{O}_2$  с субстратом в данном растворителе:

$$1/\beta = \tau_{\Delta}(k_3 + k_4). \quad (6.5)$$

Очевидно, что величина  $\beta$  зависит от субстрата и растворителя и будет одинаковой при использовании разных сенсибилизаторов. С другой стороны, величина  $1/\beta$  представляет собой не что иное,

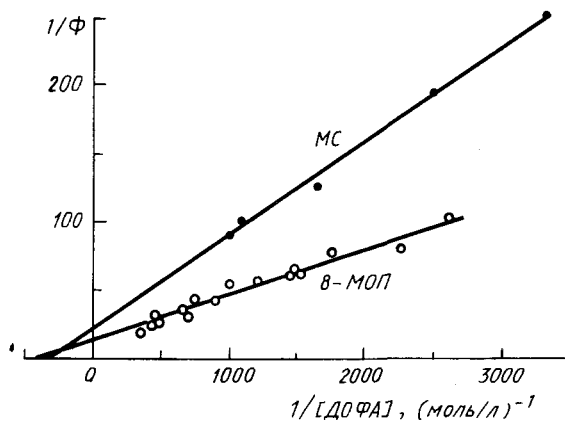


Рис. 6.3. Зависимость квантового выхода фотолиза ( $\Phi$ ) от концентрации диоксифенилаланина ДОФА в обратных координатах, фотосенсибилизированного метиленовым синим (МС) и 8-МОП (В. Л. Сухо-руков, 1984)

страта окисления. Действительно, она является произведением квантового выхода генерации синглетного кислорода фотосенсибилизатором  $\Phi_{\Delta}$  и величины  $\psi_{\infty}$ , которая указывает, какая доля всех молекул субстрата, тушащих  $^1\text{O}_2$ , подвергается химическому превращению. Квантовые выходы генерации синглетного кислорода при освещении растворов различных фотосенсибилизаторов могут быть измерены на основании регистрации люминесценции синглетного кислорода. В табл. 6.1 приведены значения  $\Phi_{\Delta}$ , полученные А. А. Красновским (мл.) для некоторых фотосенсибилизаторов.

Зная экспериментально найденные  $\Phi_{\infty}$  и  $\Phi_{\Delta}$ , можно рассчитать по уравнению (6.3) величину  $\psi_{\infty}$ , которая, как и  $\beta$ , характеризует субстрат окисления. Но если  $1/\beta$  характеризует эффективность субстрата как тушителя синглетного кислорода, то  $\psi_{\infty}$  показывает, насколько эффективно это взаимодействие с  $^1\text{O}_2$  сопровождается химическим разрушением субстрата.

В рассмотренном выше примере фотосенсибилизированного МС фотоокисления ДОФА  $\Phi_{\Delta}$  для МС составляет  $\sim 0,5$  и, таким

как константу Штерна—Фольмера  $K$  в уравнении (2.28) (см. разд. 2.12). Это позволяет непосредственно определить  $\beta$ , изучая тушение люминесценции синглетного кислорода субстратом в таком же растворителе; источником синглетного кислорода может служить любой сенсибилизатор, способный его генерировать под действием освещения.

Величина  $\Phi_{\infty}$ , как видно из уравнения (6.3), зависит как от свойств фотосенсибилизатора, так и от суб-

Таблица 6.1. Квантовые выходы генерации  $^1\text{O}_2$  фотосенсибилизаторами

Сенсибилизатор	Растворитель	$\Phi_{\Delta}$	Сенсибилизатор	Растворитель	$\Phi_{\Delta}$
Антрацен	$\text{CCl}_4$	0,15	Псорален	$\text{CCl}_4$	0,0055
	Метанол	0,7		Метанол	0,05
Протопорфирин	$\text{CCl}_4$	0,75	8-МОП	$\text{D}_2\text{O}$	0,04
Рибофлавин	$\text{D}_2\text{O}$	0,3		$\text{CCl}_4$	0,002
Хлорофилл <i>a</i>	$\text{CCl}_4$	0,55		Метанол	0,009
Эозин	Ацетон	0,12	$\text{D}_2\text{O}$	0,02	

образом,  $\psi_{\infty} = 0,048/0,5 \approx 0,1$ . Это означает, что из 10 молекул  $^1\text{O}_2$ , столкновение субстрата с которыми привело к дезактивации возбужденного состояния, только в одном случае произошло разрушение молекулы субстрата. Аналогичные оценки, проведенные для других субстратов, дают иные величины  $\psi_{\infty}$ . Например, для токоферола  $\psi_{\infty} \approx 0,01$ .

Наиболее часто синглетный кислород генерируют, освещая сенсibilизаторы — метиленовый синий, зозин, бенгальский розовый, протопорфин, антрацен, 3,4-бензпирен.

Для окисления синглетным кислородом веществ, находящихся в жидкой фазе, удобна гетерогенная система. Сенсibilизатор наносят на поверхность силикагеля, и покрытые таким образом частицы суспендируют в растворе, содержащем соединение, которое необходимо окислить. Например, бенгальский розовый растворяли в метаноле и смешивали с силикагелем (25 мг красителя на 1 г силикагеля). После удаления растворителя получали равномерно покрытые красителем частицы силикагеля. Этот твердый порошок использовали в качестве эффективной системы для получения  $^1\text{O}_2$  в неполярных растворителях.

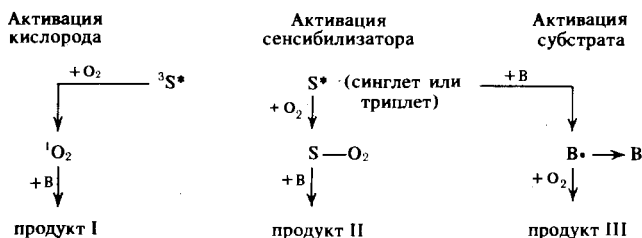
Химически синглетный кислород легко окисляет ненасыщенные соединения, образуя гидропероксиды, диоксетаны, эндопероксиды и др. Биологические последствия окисления синглетным кислородом многообразны: повреждение структуры биомембран, приводящее, в частности, к гемолизу эритроцитов; инактивация ферментов; индукция эритемы и отека кожи; загар и др.

### 6.3. Другие механизмы фотосенсibilизированного окисления

В некоторых случаях экспериментально определяемый предельный квантовый выход сенсibilизированной фотохимической реакции  $\Phi_{\infty}$  существенно превышает тот, который можно ожидать на основании известных величин квантового выхода генерации синглетного кислорода  $\Phi_{\Delta}$  и эффективности  $\psi_{\infty}$  его использования в химической реакции данным субстратом (6.3). Это относится к реакциям фотоокисления, сенсibilизированным 8-МОП. Так, при фотоокислении ДОФА в присутствии данного сенсibilизатора рассчитанная величина  $\Phi_{\infty} = \Phi_{\Delta} \psi_{\infty} = 0,02 \cdot 0,1 = 0,002$ , тогда как найденная экспериментально [см. уравнение (6.3)] составляет  $\Phi_{\infty} = 0,07$ . При фотосенсibilизированном 8-МОП окислении  $\alpha$ -токоферола для спиртового раствора  $\Phi_{\Delta} = 0,009$ ;  $\psi_{\infty} = 0,01$ . Таким образом, рассчитанная  $\Phi_{\infty} = 1 \cdot 10^{-4}$ , тогда как в опыте получено  $\Phi_{\infty} = 0,016$ . Такая высокая эффективность фотодинамического сенсibilизатора говорит о том, что он осуществляет свою функцию иначе, чем рассмотрено в разделе 6.2, т. е. не через синглетный кислород.

Как можно представить себе фотосенсибилизированное окисление субстрата, идущее не через стадию (I) синглетного кислорода? Вероятно, как реакцию, идущую через стадию (II) активной формы самого сенсибилизатора, либо через стадию (III) прямой активации субстрата сенсибилизатором.

Схематически это можно представить следующим образом:



На этой схеме  $S-O_2$  означает активную форму сенсибилизатора,  $B \cdot$  — активную форму субстрата (возможно, это свободные радикалы). Химическое строение как активной формы сенсибилизатора, так и активной формы продукта может быть различным в разных реакциях.

Необходимо подчеркнуть, что выявить, по какому из трех механизмов протекает процесс фотосенсибилизированного окисления, — задача непростая. Так, например, можно показать, что если реакция идет по механизму II, то зависимость  $1/\Phi$  от  $1/[B]$  также линейная. Отсечка на оси абсцисс даст нам значение  $\beta$ , равное концентрации субстрата, когда субстрат взаимодействует с половиной активированных молекул (или радикалов) сенсибилизатора. Таким образом, само по себе знание величины  $\beta$  еще не позволяет сделать однозначный вывод о механизме реакции; для этого нужно привлекать другие данные.

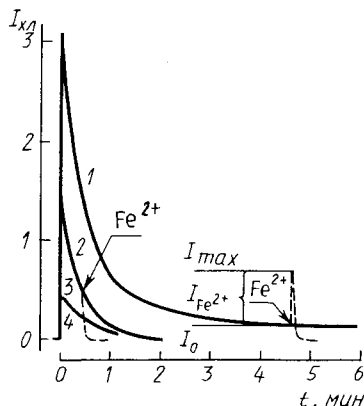
В каждом конкретном случае для выяснения механизма сенсибилизированного окисления приходится применять широкий арсенал методов. К ним относятся ингибиторный и кинетический анализ, различные методы прямого определения лабильных промежуточных фотопродуктов (ЭПР, импульсный фотолиз и радиолиз, оптическая спектроскопия и др.).

Остановимся на результатах, полученных при изучении активированной формы фотосенсибилизаторов — псораленов. В этих соединениях активация сенсибилизатора представляет собой образование фотоокисленного псоралена (ФОП), который вступает в последующую реакцию окисления субстрата. ФОП можно накопить, облучая раствор псоралена в органическом растворителе, например этаноле или ацетоне. При попадании в водный раствор ФОП разлагается: процесс сопровождается хемилюминесценцией, затухающей в течение нескольких десятков секунд (рис. 6.4).



Рис. 6.4. Кинетика хемиллюминесценции при смешивании этанольных растворов 8-МОП с водой (2) или с суспензией липосом (1, 3, 4):

1, 2—8-МОП фотоокислялись в этанольном растворе; 3—8-МОП облучали в отсутствие кислорода; 4—необлученный 8-МОП ( $10^{-5}$  M), липосомы из фосфолипидов яйца (4 мг/мл). Пунктирные линии показывают влияние ионов  $Fe^{2+}$  на хемиллюминесценцию; в отсутствие липосом  $Fe^{2+}$  тушит хемиллюминесценцию; в липосомах, обработанных фотоокисленным 8-МОП, в ответ на введение  $Fe^{2+}$  возникает вспышка хемиллюминесценции ( $I_{Fe^{2+}}$ ), свидетельствующая об образовании пероксидов ненасыщенных липидов; по абсциссе — время после смешивания растворов 8-МОП с водой



Если молекулы субстрата в это время присутствовали в водном растворе, то они окислялись. Если их добавляли после прекращения хемиллюминесценции, то окисления не происходило. Поэтому можно сделать вывод, что ФОП стабилен в органических растворителях, но быстро распадается в воде с образованием реакционно-способных интермедиаторов, которые и взаимодействуют с биомолекулами. Если во время водного распада ФОП присутствовали эритроциты, то индуцировался гемолиз:



В заключение отметим, что соотношение между процессами I, II и III в реакциях фотосенсибилизированного окисления зависит от условий окружения. Например, гематопорфирин в водных растворах или в мицеллах сенсибилизирует фотоокисление триптофана путем прямой реакции (без  $^1O_2$ ), если концентрация триптофана высока, тогда как при низкой концентрации реакция идет за счет участия  $^1O_2$ . Связывание сенсибилизаторов с биологическим субстратом обычно способствует протеканию реакций с прямым участием активной формы субстрата (или сенсибилизатора). Например, метиленовый синий, связавшийся с эпидермисом кожи, перестает генерировать синглетный кислород. Генерация  $^1O_2$  гематопорфирином при связывании с эпидермисом ослабляется более чем в два раза по сравнению с водным мицеллярным раствором и почти в 10 раз по сравнению с раствором в этаноле. Одновременно возрастает удельный вклад свободнорадикальных реакций.

## ГЛАВА 7

### ФОТОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ В КОЖЕ.

#### ФОТОМЕДИЦИНА

Раздел медицины, посвященный терапевтическому применению или патологическим последствиям действия оптического излучения, называется *фотомедициной*. Из всего оптического диапазона наиболее эффективно ультрафиолетовое излучение. Главная мишень действия ультрафиолетового излучения — кожа человека и животных, так как глубже кожи ультрафиолет не проникает (рис. 7.1).

Все фотобиологические процессы в фотомедицине принято делить на *фототоксические* и *фотоаллергические*. Фототоксические эффекты возникают под действием оптического излучения, поглощенного экзогенным или эндогенным сенсибилизатором. Такие эффекты наблюдаются у всех испытуемых, характеризуются наличием пороговой дозы, эффект усиливается с увеличением дозы или концентрации вещества. К фототоксическим соединениям относятся псоралены (фурокумарины), порфирины, тетрациклины, фенотиазины, сульфаниламиды, хлорпромазин, гризеофульвин и др. Клинически фототоксические эффекты проявляются в форме эритемы, отека, пигментации и т. д.

Многие фототоксические соединения, в первую очередь псоралены и порфирины, в сочетании со световым облучением обладают терапевтическим действием при псориазе и других заболеваниях кожи. В этих случаях говорят о фототерапевтических эффектах.

От фототоксических эффектов следует отличать фотоаллергические, которые также возникают после поглощения света химическим соединением в коже, но обязательно нуждаются в первичной иммунологической сенсибилизации. Фотоаллергию от фототоксичности отличают по двум критериям:

1) фотоаллергия перед проявлением эффекта требует несколь-

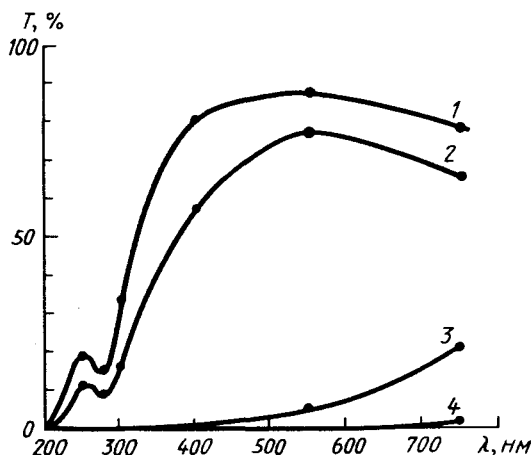


Рис. 7.1. Спектры пропускания поверхностных тканей белого человека:

1 — верхний слой эпидермиса толщиной 0,03 мм (роговой слой); 2 — слой эпидермиса толщиной 0,05 мм; 3 — кожа, (2 мм), 4 — кожа и подкожная ткань (25 мм)

ких сенсibiliзирующих воздействий, тогда как для индукции фототоксического эффекта достаточно одного облучения;

2) только у малой доли испытуемых проявляется чувствительность к данному фотоаллергену, тогда как фототоксический эффект проявляется у всех экспонировавшихся индивидуумов. Важно отметить, что некоторые вещества дают фототоксический эффект в высоких дозах, но фотоаллергию вызывают после нескольких малых доз.

Так как практически все фототоксические и фотоаллергические эффекты инициируются в коже, необходимо представить строение кожи. Эпидермиса (0,07—0,12 мм) и дермы (1—2 мм)—собственно кожи (рис. 7.2). В эпидермисе поглощается большая часть ультрафиолета. Эпидермис—это многослойный эпителий, состоящий главным образом из эпидермальных клеток—кератиноцитов. Там же присутствуют клетки нейроэктодермального происхождения—меланоциты и др. Кератиноциты образуют пять параллельных поверхности слоев, каждый из которых соответствует определенной стадии дифференциации кератиноцитов. К дерме примыкает базальный слой (*stratum basale*), затем идут шиповидный (*stratum spinosum*), зернистый (*stratum granulosum*), блестящий и роговой слои (*stratum corneum*). Базальные клетки имеют столбчатую форму, способны делиться и отвечают за рост эпидермиса. Зернистые клетки уплощены и содержат гранулы кератогиалина. Роговой слой состоит из омертвевших плоских кератиноцитов.

В базальном слое находятся меланоциты—пигментные клетки, имеющие меланосомы—гранулы с меланином. Эти клетки содержат фермент тирозиназу, участвующий в превращении тирозина в меланин и под действием света могут резко менять свою форму, образуя псевдоподии.

Под эпидермисом лежит дерма, имеющая два слоя—сосочковый и ретикулярный. Поверхностный, сосочковый слой сформирован рыхлой соединительной тканью, пронизанной коллагеновыми, эластиновыми, мышечными и нервными волокнами, а также кровеносными сосудами (капилляры, вены, артериолы). В ретикулярном слое содержатся также тучные и другие типы клеток.

Благодаря высокому содержанию поглощающих свет веществ (белки, нуклеиновые кислоты, пигменты), а также неоднородности

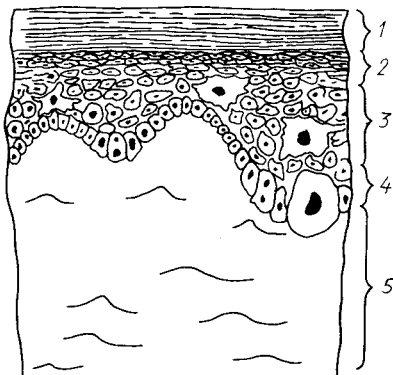


Рис. 7.2. Строение эпидермиса: 1—роговой слой; 2—базальный; 3—шиповидный; 4—базальный; 5—дерма

кожа за счет поглощения, отражения и рассеивания хорошо ослабляет оптическое излучение. УФ-излучение с  $\lambda < 315$  нм поглощается почти полностью уже в эпидермисе (см. рис. 7.1).

## 7.1. Эритема

Эритема—это покраснение кожи, возникающее вследствие расширения кровеносных сосудов кожи—гиперемии.

Спектры действия эритемы, индуцируемой ультрафиолетом, измеряют начиная с 20-х годов XX в. (рис. 7.3). Однако споры, касающиеся формы и интерпретации этих спектров, не утихают. Спектры действия получали одним из двух способов:

1. Серию участков кожи облучали одинаковыми дозами монохроматического УФ-излучения. Через определенное время (чаще 24 ч) оценивали степень покраснения облученных участков. Строили график зависимости: степень покраснения как функция длины волны.

2. Для каждой длины волны определяли величину минимальной эритемной дозы (МЭД), называемой иногда биодозой, т. е. дозу, вызывавшую минимальное обнаруживаемое глазом покраснение через определенное время после облучения (обычно 24 ч). Спектры действия измерялись исследователями на произвольных участках тела в разных условиях и сильно отличались друг от друга. В. В. Кобленц и др. (1932) ввели усредненный по данным многих авторов спектр действия, который длительное время считался истинным, стандартным спектром действия и имел максимум при 297 нм, провал при 280 нм и коротковолновый максимум при 245—248 нм, составляющий 0,57 от максимума при 297 нм.

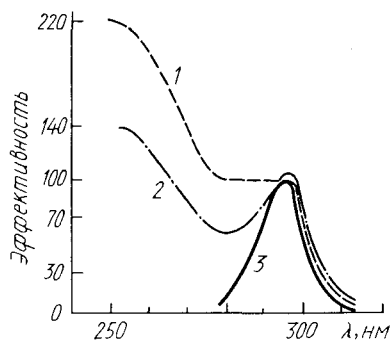


Рис. 7.3. Спектры действия эритемы:

Эритемную эффективность оценивали по величине МЭД через 8 ч (1); 24 ч (2), по степени покраснения через 10 сут после УФ-облучения (3)

В настоящее время стало ясно, что не существует одного «стандартного» спектра действия эритемы— он может быть суммой двух или трех компонентов.

Характеристики эритемы, вызываемой разными участками УФ-спектра, значительно отличаются. Именно фотобиологические исследования на коже привели к необходимости разделить весь УФ-спектр на три участка: УФА (320—400 нм); УФВ (280—320 нм) и УФС (<280 нм).

УФА-излучение наименее эффективно. Эритемная эффективность (1/МЭД) при 365 нм в  $\sim 100$ —1000 раз ниже, чем при 297 нм. УФА-эритема проявляется сразу по-

сле облучения. При пороговой дозе ( $\sim 130 \text{ кДж} \cdot \text{м}^{-2}$ ) немедленно возникающее покраснение проходило за несколько минут. При дозе УФА  $500 \text{ кДж} \cdot \text{м}^{-2}$  покраснение сохраняется до 24 ч. УФА-эритема имеет фиолетовый оттенок, что указывает на расширение глубоко расположенных сосудов дермы. УФА-излучение вызывает гистологически обнаруживаемую воспалительную реакцию в дерме, но не в эпидермисе.

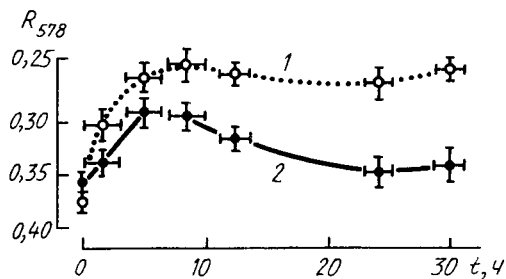


Рис. 7.4. Кинетика развития УФВ-эритемы после облучения кожи человека дозой 2 МЭД: 1 — без  $\alpha$ -токоферола; 2 — в присутствии  $\alpha$ -токоферола ( $10^{-9}$  моль  $\cdot$  см $^{-2}$  кожи);  $R_{578}$  — отражательная способность кожи при 578 нм

УФВ-эритема значительно отличается от УФА-эритемы. УФВ-эритеме всегда предшествует латентный период, длительность которого обратно пропорциональна дозе УФВ-облучения, но никогда не превышает 8—10 ч. Длительность УФВ-эритемы пропорциональна дозе. Степень покраснения кожи пропорциональна логарифму дозы. Наиболее яркое покраснение после УФВ-облучения приходится на 8—10 ч (рис. 7.4). МЭД значительно отличается для кожи в различных частях тела. Например, для кожи живота белого незагорелого человека МЭД составляет  $210 \text{ Дж} \cdot \text{м}^{-2}$ , а для кожи ноги —  $780 \text{ Дж} \cdot \text{м}^{-2}$ . На основании регистрации кинетики эритемы можно думать, что самые малые значения минимальной эритемной дозы получаются, если наблюдение проводить через  $\sim 8$  ч после УФ-облучения, а не через 24 ч, как это делалось большинством авторов. После УФ-облучения гистологически обнаруживается воспалительная реакция как в дерме, так и в эпидермисе.

УФС-эритема, аналогично УФВ-эритеме, имеет латентный период, не превышающий 8—10 ч. Однако длительность латентного периода УФС-эритемы больше, чем УФВ-эритемы, если облучение проводили равным числом МЭД. УФС-эритема проходит раньше УФВ-эритемы и никогда не бывает ярко-красной. УФВ-излучение в дозе 10 МЭД вызывает сильнейший ожог кожи — эдему, с образованием на коже пузырей. УФС-излучение в любых дозах вызывает только розовую эритему, никогда не переходящую в эдему.

Из описания УФА-, УФВ- и УФС-эритемы ясно, что форма спектра действия будет зависеть от времени, прошедшего между облучением и регистрацией покраснения кожи. Если МЭД определять через 8 ч после УФ-облучения, то эритемная эффективность при 250 нм оказывается выше, чем при 292—297 нм. При увеличении сроков наблюдения до 24 ч спектр действия по форме

приближается к стандартному. Если покраснение регистрировать через 10 сут после облучения, то в спектре действия остается только один максимум в УФВ-области (см. рис. 7.3).

Три типа эритемы различаются по механизму инициирования и развития. Можно думать, что акцепторами квантов в этих трех случаях являются разные хромофоры, находящиеся к тому же на разной глубине в коже. К сожалению, до сих пор нет сколько-нибудь ясных указаний на природу этих хромофоров. Предполагается, что первичными акцепторами действующих квантов являются белки с максимумом поглощения при 280—285 нм. Однако в стандартном спектре действия около 280 нм находится не максимум, а провал. Этот провал объясняли экранирующим эффектом белков рогового слоя эпидермиса. Кроме того, можно предположить (Д. И. Рошупкин), что максимум при 292—294 нм в спектре действия принадлежит антиоксиданту  $\alpha$ -токоферолу, имеющему максимум в спектре поглощения при 292 нм. Для возникновения УФВ-эритемы необходимо фотохимически разрушить антиоксиданты в коже. Обе точки зрения не являются строго доказанными и нуждаются в дальнейшем экспериментальном подтверждении.

Вслед за фотохимическими реакциями в коже развиваются темновые биохимические реакции, приводящие к расширению сосудов дермы (вазодилатации)—эритеме. Считалось, что активным интермедиатором эритемы является известный вазодилататор—гистамин. Гистамин может фотохимически образовываться из гистидина. Однако фотохимическое образование достаточных количеств гистамина в коже при эритемных дозах облучения нереально из-за низкого содержания гистидина и низкого квантового выхода фотохимической реакции. Вообще ответ кожи как ткани на УФ-облучение, несомненно, не ограничен фотохимическими превращениями определенных молекул, включает в себя активацию клеток и выброс интермедиатов в систему микроциркуляции. Д. И. Рошупкин и сотр. (1977) обнаружили, что УФВ-эритема ослаблялась или совсем не развивалась, если на кожу наносились ингибиторы цепного окисления липидов (антиоксиданты)  $\alpha$ -токоферол или инол. Ингибирующий эффект антиоксидантов мало зависел от того, присутствовали они в коже в момент УФВ-облучения или наносились сразу после этого. Следовательно, антиоксиданты ингибируют не фотохимическую стадию эритемы, а темновые пострадиационные реакции. Это значит, что ведущую роль среди эритемных темновых реакций, развивающихся в коже после УФВ-облучения, играют реакции пероксидного цепного окисления липидов кожи. Отсюда возникла гипотеза, что максимум спектра действия УФВ-эритемы  $\sim 292$ — $294$  нм может отражать не столько эффект экранировки (см. выше), сколько факт поглощения действующих фотонов  $\alpha$ -токоферолом и его фотолиза в качестве условия развития пероксидного окисления липидов, выступающего начальным звеном эритемной реакции кожи.

Нанесение на кожу антиоксидантов через 5 часов после УФВ-облучения уже не приводит к ингибированию эритемы.

В коже есть система ферментов для образования простагландинов из полиненасыщенных жирных кислот. Простагландины образуются в эпидермисе вскоре после УФВ-облучения в повышенных количествах и обладают прямым сосудорасширяющим действием на сосуды дермы. Д. С. Сneider и другие показали, что ингибиторы синтеза простагландинов (индометацин и аспирин) способны подавлять эритему, если их вводить не позднее чем через 24—28 ч после УФВ-облучения.

Следовательно, в первые часы важнейшую роль играют процессы перекисидации липидов, затем продукты окисления липидов активируют синтез простагландинов. Поздние стадии (более 24 ч) протекают без участия простагландинов, так как в эти сроки введение в кожу антипростагландиновых агентов неэффективно.

Важно отметить, что темновые стадии УФС- и УФА-эритемы иные, чем УФВ-эритемы. Например, УФС-эритема совершенно не ингибируется антиоксидантами, а УФА-эритема не ингибируется антипростагландиновыми агентами.

Для УФВ- и УФС-эритемы характерно явление фотореактивации. Если после УФВ- или УФС-облучения кожу осветить видимым светом, то эритемный эффект уменьшается (С. С. Жихарев, 1937; Дж. К. Ван дер Леун, 1969; К. А. Самойлова и др., 1977). Явление фотореактивации хорошо изучено на микроорганизмах и заключается в активации видимым светом фермента, фотореактивирующего тиминовые димеры ДНК. В последние годы такой фермент обнаружен и в клетках кожи человека. Однако роль УФ-повреждения ДНК в индукции эритемы остается неясной.

Темновые реакции, приводящие к эритеме, очень сложны и включают как гуморальные, так и нейрорефлекторные механизмы не только в коже, но и во всем организме.

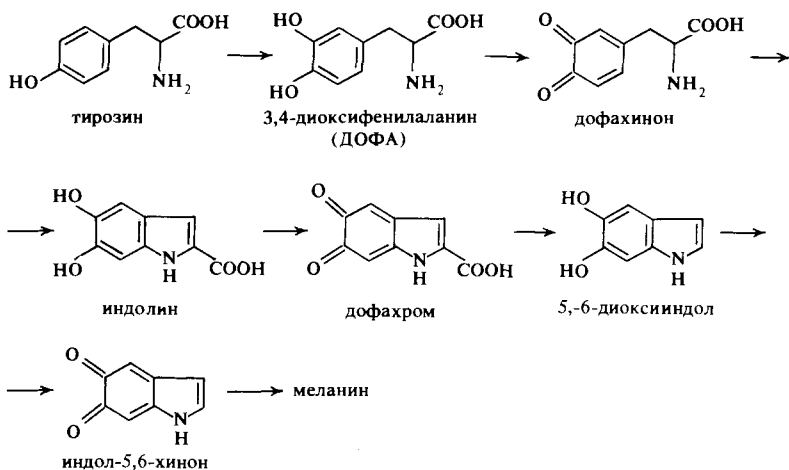
## 7.2. Пигментация кожи (загар)

Пигментация кожи—защитный фотобиологический процесс, приводящий к образованию пигмента меланина, который защищает кожу от фотоповреждения несколькими способами. Во-первых, пигмент поглощает фотоны и ослабляет интенсивность действующего излучения. Во-вторых, меланин является перехватчиком свободных радикалов, образующихся при облучении кожи. Наконец, меланины связывают ионы железа, которые катализируют процесс пероксидного окисления липидов. Тем самым меланины ингибируют цепные реакции пероксидного окисления липидов и другие свободнорадикальные реакции.

Различают два процесса пигментации. Главный из них—*непрямая пигментация*, начинающаяся вслед за эритемой через 2—3 сут

после облучения. Другой вид — *прямая пигментация* — возникает прямо под лучами, достигает максимума за 1—2 ч и уменьшается через 3—24 ч после облучения.

**Непрямая пигментация.** Первичные стадии возникновения загара до сих пор не известны. Ясно только, что ультрафиолет каким-то образом запускает сложную цепь темновых реакций биосинтеза меланина. Непрямая пигментация активируется излучением с  $\lambda < 320$  нм. Спектр действия загара напоминает спектр действия эритемы. В то же время, как показано К. А. Самойловой с сотр., большие дозы коротковолнового ультрафиолета (254 нм) блокируют пигментобразование под действием естественного солнечного излучения. Эффект блокирования загара коротковолновым УФС-излучением сохраняется 1—1,5 месяца и связан, вероятно, с повреждением аппарата меланогенеза. Под действием УФВ-излучения в коже в ходе темновых биохимических реакций активируется фермент тирозиназа, участвующая в превращении тирозина в меланин:



Две первые стадии образования меланина проходят с участием ферментов. Последующие реакции легко осуществляются спонтанно с участием супероксиданиона и других свободных радикалов.

Непрямую пигментацию называют также замедленной, так как она начинается через 2—3 сут после облучения, достигает максимума на 13—21-й день и затем угасает за несколько месяцев.

Синтез меланина осуществляется в специальных органеллах меланоцитов — меланосомах. УФ-излучение вызывает следующие эффекты в коже:

- 1) активируется пролиферация меланоцитов;
- 2) меланоциты гипертрофируются и выпускают разветвленные цитоплазматические выросты псевдоподий;
- 3) увеличивается число меланосом;



- 4) растет скорость образования меланина в меланосомах;
- 5) усиливается перенос меланосом в кератиноциты, это совпадает с увеличением скорости деления и смены кератиноцитов;
- 6) возрастает размер меланосом (особенно выраженный у представителей кавказской и монголоидной рас);
- 7) в эпидермисе повреждаются ингибирующие тирозиназу сульфгидрильные соединения, за счет чего возрастает активность этого фермента.

Прямая (немедленная) пигментация никогда не приводит к сильному потемнению кожи. Спектр действия прямой пигментации представляет собой широкую неструктурированную полосу в области 300—700 нм с максимумом около 400—480 нм.

Механизм прямой пигментации включает в себя прямое фотохимическое окисление восстановленного предшественника меланина в меланин. Этот процесс осуществляется в меланоцитах через образование семихинонов. Кроме того, электронно-микроскопическое исследование показало, что частично потемнение кожи в ходе прямой пигментации происходит в результате активного передвижения меланосом в псевдоподии меланоцитов. Это происходит с участием микротрубочек и микрофиламентов.

Новые меланосомы при этом не образуются. Хотя прямая пигментация и не бывает очень интенсивной, но благодаря ей частичная защита от радиации осуществляется уже непосредственно под лучом.

### 7.3. Фотоканцерогенез

Ультрафиолетовое излучение способно вызывать рак кожи у людей. На это указывают следующие факты. Опухоль возникает преимущественно на открытых участках тела — на коже лица и наружной стороны рук. Чаще встречается у людей, работающих вне помещений. У негров рак кожи возникает реже, чем у белых. Очевидно, защитную роль у негров выполняет меланин, служащий одновременно оптическим экраном и антиоксидантом. Фотоканцерогенез — обычно кумулятивный процесс, возникающий при хроническом облучении. Но если УФ-облучение прервать на очень большой срок, скажем на полгода, то эффект предыдущего облучения снимается. В некоторых уникальных ситуациях удавалось вызвать рак однократным УФ-облучением. Например, если объектом исследования брали безволосых мышей, для которых характерна высокая вероятность рака кожи, то примерно через 7 недель после одного сеанса облучения (280—320 нм,  $3 \cdot 10^4$  —  $24 \cdot 10^4$  Дж  $\cdot$  м<sup>-2</sup>) у них развивался рак кожи.

Спектр действия фотоканцерогенеза детально не измеряли. Согласно оценочным данным рак кожи возникает под действием ультрафиолета с  $\lambda < 320$  нм. На это, в частности, указывает то обстоятельство, что частота заболевания возрастает с умень-

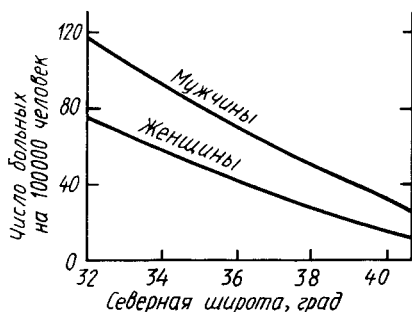


Рис. 7.5. Зависимость частоты заболеваний раком кожи от географической широты

шением географической широты (рис. 7.5). Известно, что ближе к экватору граница солнечного ультрафиолета сдвигается в область коротких длин волн (вплоть до 285 нм). Следует отметить, что с изменением длины волны действующего излучения меняется характер заболевания. Тип опухоли зависит от глубины проникновения излучения. Монохроматический ультрафиолет 254 нм вызывает главным образом эпидермальные карциномы, а 280 нм — преимущественно саркомы.

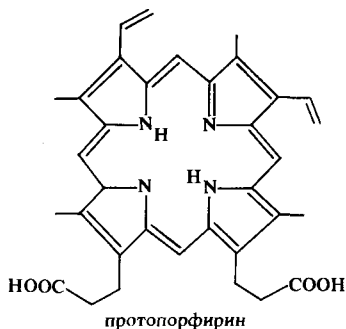
Физико-химические стадии фотоканцерогенеза не выяснены. Важную роль может играть повреждение ДНК клеток кожи. Из других реакций привлекает внимание фотоокисление липидов. При хроническом УФ-облучении в коже возрастает содержание канцерогенного продукта окисления холестерина — холестерин-5 $\alpha$ , 6 $\alpha$ -эпоксида. В процессе УФ-канцерогенеза в коже, вероятно, могут вовлекаться и другие продукты фотоокисления липидов.

УФ-индукция рака кожи усиливается в присутствии канцерогенных соединений, например 3,4-бензпирена. Канцерогенные углеводороды поглощают УФ-излучение и могут служить фотосенсибилизаторами. Известно, что бензпирен фотохимически реагирует с ДНК и вызывает фотодинамическое повреждение мембран клеток. Однако механизм взаимодействия ультрафиолета и канцерогенов в индукции рака может быть более сложным. Так, было показано, что УФ-облучение (275—315 нм) кожи, предшествовавшее нанесению на кожу 7,12-диметилбензатрацена (ДМБА), усиливало индукцию рака кожи этим канцерогеном. Однако если сначала нанести ДМБА, а потом облучить кожу, то канцерогенный эффект углеводорода ослаблялся. Очевидно, что синергическое действие ультрафиолета и канцерогена в этом случае не может быть объяснено эффектом фотосенсибилизации. Более того, ультрафиолет вызывал фотоокисление ДМБА и утрату им канцерогенных свойств.

#### 7.4. Фототоксические эффекты протопорфиринов

Протопорфирины — типичные представители фотодинамических сенсибилизаторов. Фотохимические реакции, которые они ведут, на 100% нуждаются в присутствии кислорода. Протопорфирины — промежуточные соединения на пути синтеза геминных группировок гемоглобина, цитохромов и т. д. У здоровых людей концентрация протопорфиринов в коже и других тканях незначи-

тельно и ощутимые фототоксические эффекты не имеют места. Однако при нарушениях обмена концентрация протопорфирина в крови может резко повыситься и тогда под действием света развиваются эритема, эдема, пигментация. Спектр действия этих фототоксических эффектов соответствует спектру поглощения протопорфирина, максимум находится при 404 нм. Чтобы избежать световых ожогов, больные протопорфириями вынуждены жить при желтом свете, не поглощаемом протопорфирином.



Молекулярный механизм фототоксических эффектов протопорфирина хорошо изучен на модельных системах. Показано, что протопорфирины фотосенсибилизируют окисление липидов и многих белков. Например, описана фотоинактивация АТФ-азы эритроцитов, ацетилхолинэстеразы и т. д. Легко происходит фотодинамическая полимеризация мембранного белка эритроцитов — спектрина (в результате окисления остатков метионина, сульфгидрильных групп, гистидина, тирозина и триптофана). Окислительное повреждение белков и липидов приводит к резкому возрастанию проницаемости мембран эритроцитов и их гемолизу, увеличению проницаемости мембран клеток кровеносных сосудов.

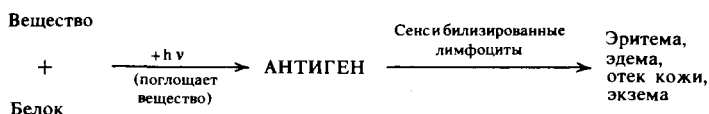
Фотоокислительные реакции протопорфиринов (П) протекают с участием электронно-возбужденного синглетного кислорода ( $^1O_2$ ) согласно схеме:

- 1)  $P_0 + h\nu \rightarrow ^1P^* \rightarrow ^3P^* \xrightarrow{O_2} P_0 + ^1O_2 (^1\Delta_g)$
- 2)  $^1O_2 + \text{Субстрат} \rightarrow \text{Оксисленный субстрат}$

Так как синглетный кислород — главный интермедиат сенсibilизированного протопорфиринами окисления, эти реакции можно ингибировать тушителем синглетного кислорода  $\beta$ -каротином ( $k_q = 10^{10} \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ ).  $\beta$ -Каротин — природное и нетоксичное соединение, поэтому его можно вводить больным протопорфирией. В норме уровень  $\beta$ -каротина в плазме крови составляет 2 мкг/мл, если увеличить его в 4—5 раз (до 9—10 мкг/мл), то больные значительно лучше переносят яркий солнечный свет.

## 7.5. Фотоаллергия

Наиболее часто фотоаллергические эффекты вызывают хлорпромазин, сульфаниламиды, прометазин и другие лекарственные препараты, эти соединения используются как антибактериальные, антигрибковые препараты и транквилизаторы. Они содержат ароматические кольца и галогены и поглощают свет в УФ-области спектра. Доказано, что фотоаллергены фотохимически присоединяются к белкам, по-видимому, именно эта реакция и приводит к формированию иммунного света. Фотохимически образованный аллерген взаимодействует с макрофагами и Т-лимфоцитами. При первом воздействии света на лекарственные вещества в коже происходит аллергическая сенсibilизация Т-лимфоцитов. При даже очень слабых повторных воздействиях Т-лимфоциты узнают аллерген и возникает ответная реакция кожи (уртикария или экзема), часто наблюдается анафилактический шок или астма. Таким образом, фотоаллергическую реакцию организма можно представить в виде схемы (И. Кочевар)



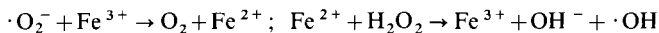
## 7.6. Фото- и фотохимиотерапия

Давно известно положительное действие света на живые объекты, от простейших до высших. Например, ультрафиолетовое облучение снижает естественную гибель и повышает темп деления инфузорий и амёб. УФ-облучение в эритемных и субэритемных дозах обладает профилактическим и лечебным действием при ряде заболеваний человека, вызывает положительные сдвиги в функциях сердечно-сосудистой, эндокринной, нейрогуморальной, дыхательной систем. Механизм фотохимических реакций, лежащих в основе этих положительных эффектов, к сожалению, почти всегда не известен. В некоторых клетках присутствуют специализированные фоторецепторы для целенаправленного положительного использования энергии фотонов. Такими рецепторами могут быть фотореактивирующие ферменты, обнаруженные в настоящее время не только у одноклеточных организмов, но и в клетках человека. Эти ферменты не обладают собственным поглощением в области  $\lambda > 300$  нм. Хромофорная группа образуется при формировании комплексов фермента с пиримидиновыми димерами ДНК. Под действием света 300—500 нм при участии этих ферментов происходит фотомономеризация пиримидиновых димеров.

С появлением лазеров открылись новые возможности использования интенсивного монохроматического света в хирургии и терапии. Мы не будем здесь останавливаться на действии лазерных скальпелей, так как оно основано в основном не на фотохимии, а на высокотемпературном нагреве ткани лучом. В последние годы накопился опыт использования лазеров в целях терапии. Наиболее известный пример — ускорение заживления ран при облучении раневой поверхности светом гелий-неоновых лазеров. Механизм такого действия излучения основан, по всей вероятности, на реактивирующем действии света лазера ( $\lambda$ -632 нм) на защитные ферменты каталазу и супероксиддисмутазу (СОД), простетические группы этих ферментов имеют полосы поглощения в красной области спектра. Фермент супероксиддисмутазы (СОД) катализирует реакцию образования пероксида водорода из супероксидных радикалов ( $\cdot\text{O}_2^-$ ), которые продуцируются фагоцитами в очагах воспаления:



При недостаточной активности СОД и каталазы в реакцию с супероксидным радикалом вступают ионы железа; при этом процесс заканчивается образованием высокотоксических гидроксильных радикалов  $\cdot\text{OH}$ :



В очаге воспаления имеет место инактивация СОД пероксидом водорода, а также в результате низких значений рН, возможно также снижение активности каталазы и переход каталазной реакции на путь разложения  $\text{H}_2\text{O}_2$  с образованием гидроксильного радикала. Под действием лазерного излучения происходит, по последним данным, реактивация этих ферментов. На рис. 7.6 приведен результат опыта, проведенного Е. А. Горбатенковой и сотр., по реактивирующему действию света лазера на СОД. При инкубации в присутствии  $\text{H}_2\text{O}_2$  или в кислой среде  $\sim$ рН 6 СОД инактивируется; одновременно исчезает максимум поглощения при 590 нм. Освещение светом лазера приводит к восстановлению структуры простетической группы; что обнаруживается по увеличению поглощения с максимумом при 590 нм и одновременной реактивации фермента. В заключение заметим, что терапевтическое действие сильного красного света на заживающие раны использовалось еще в 30-е годы этого столетия, но затем было забыто.

Ультрафиолетовое облучение кожи в спектральной области В (280—320 нм) используется для лечения кожного заболевания —

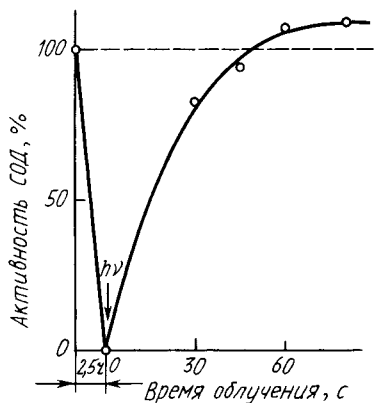


Рис. 7.6. Фотореактивация СОД под действием излучения гелий-неонового лазера (632,5 нм): перед облучением с целью инактивации СОД инкубировали 2,5 ч при рН 6, облучение проводили в той же среде; пунктирная линия — активность СОД при рН 8,2 без облучения (контроль) (Горбатенкова Е. А. и согр., 1987)

псориаза. Эффективность УФ-В терапии ограничена. Самым успешным из всех известных способов лечения псориаза в настоящее время оказалась ПУФА-терапия (комбинированное воздействие псораленов и УФ-А-излучения). Ремиссия наблюдается у 80—95% больных псориазом. ПУФА-терапия — единственный эффективный способ лечения другого кожного заболевания — витилиго. Хотя витилиго скорее косметический недостаток, заключающийся в неравномерной пигментации кожи, но в странах Азии и Африки витилиго часто превращается для больного в трагедию, так как население путает это заболевание с проказой. ПУФА-терапия успешно используется также для лечения одной из форм облысения — гнездовой плешивости и грибовидного микоза.

Одним из ограничений ПУФА-терапии оказалось то обстоятельство, что при ПУФА-воздействии помимо терапевтических могут проявиться ряд побочных эффектов, например эритема, отека, изменение механо-электрических свойств кожи и др.

Молекулярный механизм фототоксических эффектов псораленов в коже точно не установлен. Неясно поэтому, как разные фототоксические эффекты связаны друг с другом и как их можно ограничить. Эти вопросы, имеющие большое практическое значение для совершенствования ПУФА-терапии, также важны и в теоретическом плане. Знание молекулярного механизма реакций, оказывающих терапевтическое действие, поможет установить этиологию псориаза.

Курс ПУФА-терапии проводится следующим образом. Больному на кожу наносят раствор фурукумарина (локальная терапия) или больной принимает таблетку фурукумарина (системная терапия). По прошествии времени, необходимого для проникновения препарата в эпидермис и дерму, проводят УФ-А-облучение кожи. Доза разового облучения не должна вызывать эритему. Для достижения терапевтического эффекта необходимо 15—30 сеансов, курс занимает 1—2 месяца, причем со временем у больных развивается пигментация кожи. Образовавшийся меланин ослабляет ПУФА-воздействие и к концу курса лечения дозы УФ-А-облучения приходится увеличивать в несколько раз.

Итак, при ПУФА-терапии проявляются по крайней мере три фототоксических эффекта фурукумаринов: терапевтический, эрите-

ма и пигментация кожи. Как связаны между собой эти эффекты? Для ответа на этот вопрос было изучено действие антиоксидантов  $\alpha$ -токоферола и инола на перечисленные фотоэффекты. В растворах токоферол и инол играют роль ловушек свободных радикалов, образующихся при УФА-облучении фурукумаринов. Было показано далее, что эти

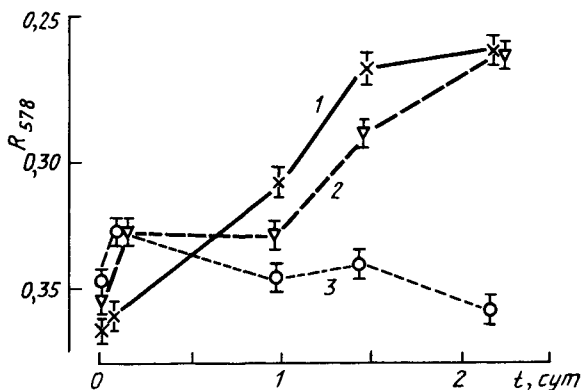


Рис. 7.7. Кинетика развития ПУФА-эритемы после облучения кожи кроликов дозой 2 МЭД: 1 — без  $\alpha$ -токоферола; 2 —  $\alpha$ -токоферол нанесен после облучения; 3 — в присутствии  $\alpha$ -токоферола ( $10^{-8}$  моль  $\cdot$  см $^{-2}$  кожи)

антиоксиданты способны ингибировать фотохимические реакции фурукумаринов в коже, приводящие к возникновению эритемы и пигментации (рис. 7.7). МЭД при этом возрастала в 1,5—2 раза. С другой стороны, опыты в модельных системах показали, что антиоксиданты не влияют на фотоприсоединение фурукумаринов к ДНК и на сенсibilизированную 8-МОП инактивацию фермента лизоцима, но значительно подавляют сенсibilизированное 8-МОП окисление липидов, а также повреждение биомолекул и мембран под действием фотоокисленных псораленов. Следовательно, в индукции ПУФА-эритемы и пигментации важные реакции сенсibilизированного окисления, а фотореакции с ДНК — нет.

Основываясь на этих данных, А. А. Каламкарян и сотр., а также Г. А. Абыев и А. Я. Потапенко испытали новый метод ПУФА-терапии псориаза, когда на кожу перед УФА-облучением вместе с фурукумарином наносили антиоксиданты. Длительность разового сеанса облучения в этом методе, так же как и в обычной ПУФА-терапии, ограничивалась эритемной реакцией кожи. Но так как эритемная реакция ослаблялась антиоксидантами, разовые дозы были увеличены. Таким образом, эритемная реакция при использовании только фурукумаринов и фурукумаринов в сочетании с антиоксидантами была одинаковой. Однако для достижения терапевтического эффекта при новом методе требовалось в 1,5—2 раза меньше сеансов ПУФА-воздействия, чем при обычной ПУФА-терапии (без антиоксидантов). Схема процессов, происходящих в коже при ПУФА-терапии, приведена на рис. 7.8.

Фототерапия без использования сенсibilизаторов применяется для лечения желтухи новорожденных. Желтуха новорожденных — следствие резкого повышения в организме концентрации билиру-

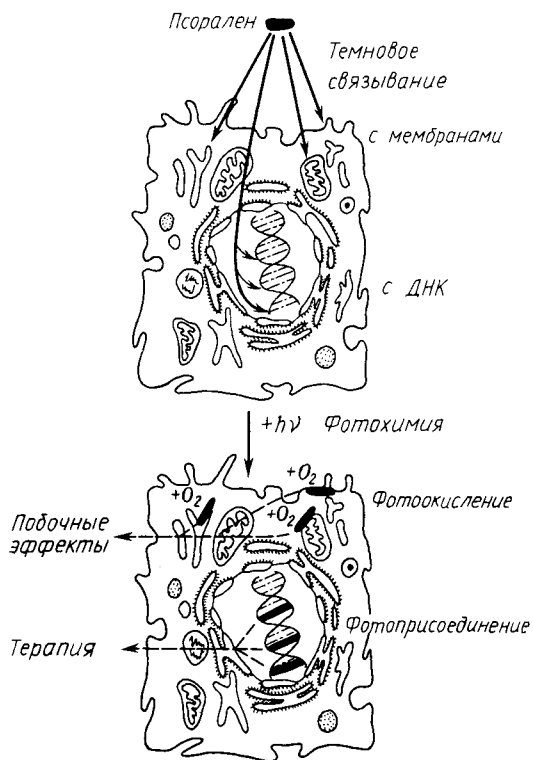


Рис. 7.8. Схема фотохимических реакций псораленов в клетке при ПУФА-терапии

бина. Билирубин образуется из гемоглобина постоянно у всех людей, из крови он устраняется при участии печени. У взрослых нормальное содержание билирубина в крови — 1 мг %, у новорожденных ~ 20 мг %. Это связано с тем, что в первые дни жизни наблюдается недостаток глюкуронилтрансферазы, превращающей билирубин крови в водорастворимый конъюгат глюкуроновой кислоты. Билирубин плохо растворим в воде и хорошо — в жире. Поэтому он в больших количествах откладывается в клетках мозга. Это приводит к необратимым изменениям в центральной нервной системе. Билирубин имеет максимум поглощения в синей области видимого спектра. Он очень легко фотоизомеризуется, и продукты его изомеризации не вызывают заметных фототоксических эффектов. Если детей освещать синим светом, то билирубин фотоизомеризуется прямо в кровеносных сосудах, образуя водорастворимые продукты. Таким способом фотохимически устраняются патологические последствия гипербилирубинемии. Сейчас такие синие лампы используют во многих родильных домах.

Фототоксичность порфиринов используют при лечении злокачественных заболеваний. Наиболее изученными соединениями являются гематопорфирин, а также продукты, получающиеся при обработке гематопорфирина кислотами (производное гематопорфирина). Эти продукты обладают свойством избирательно накапливаться в злокачественных новообразованиях, а в здоровых тканях они практически отсутствуют. Поэтому опухоли приобретают повышенную чувствительность к свету. Облучение видимым светом в присутствии производного гематопорфирина приводит к избирательной деструкции опухолей. Первоначально этот метод фотохимиотерапии применяли для лечения опухолей кожи. В



последнее время удается при помощи гибких световодов облучать светом опухоли, расположенные в легких, пищеводе, желудке и других полостях.

Поскольку введенные в организм больного порфирины накапливаются преимущественно в опухолях, то удается по характерной темно-красной люминесценции порфиринов определить число и размеры новообразований на поверхности кожи или других органов.

## ГЛАВА 8

### БИОФИЗИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЗРЕНИЯ

#### 8.1. Устройство глаза и его чувствительность к свету

В этой главе описаны процессы, протекающие от момента поглощения кванта света молекулой зрительного пигмента до возникновения рецепторного потенциала на клеточной мембране палочки.

Сначала рассмотрим, как устроен зрительный рецептор. Свет, попавший в глаз, фокусируется оптической системой на слой светочувствительных клеток сетчатки — палочки и колбочки. Палочки (их ~125 млн) располагаются по всей поверхности полусферической сетчатки и отвечают за черно-белое, или сумеречное, зрение. Колбочек значительно меньше (~6,5 млн). Они главным образом сконцентрированы в центральной части сетчатки, на прямой, проходящей через центры роговицы и хрусталика, и отвечают за цветное зрение при достаточно ярком освещении.

Строение сетчатки человека и позвоночных животных на первый взгляд может показаться парадоксальным. Светочувствительные клетки находятся в заднем слое сетчатки. Прежде чем свет попадет на них, он должен пройти через несколько слоев нервных клеток. Мало того, сами палочки и колбочки ориентированы к свету своим внутренним сегментом, не содержащим зрительного пигмента (рис. 8.1). Однако такая организация не снижает существенно чувствительности глаза к свету, так как нервные клетки и внутренние сегменты самих светочувствительных клеток прозрачны для видимого света.

Самые ранние исследования зрения касались порога чувствительности глаза. Абсолютный порог чувствительности зрения человека (т. е. минимальная еще обнаруживаемая энергия светового импульса при отсутствии светового фона и в условиях полной световой адаптации) равен  $2,1 \cdot 10^{-17} - 5,7 \cdot 10^{-17}$  Дж на поверхности роговицы глаза, что соответствует 58—148 квантам сине-зеленого света. Однако из них только 5—15 квантов поглощаются собственно молекулами зрительного пигмента в

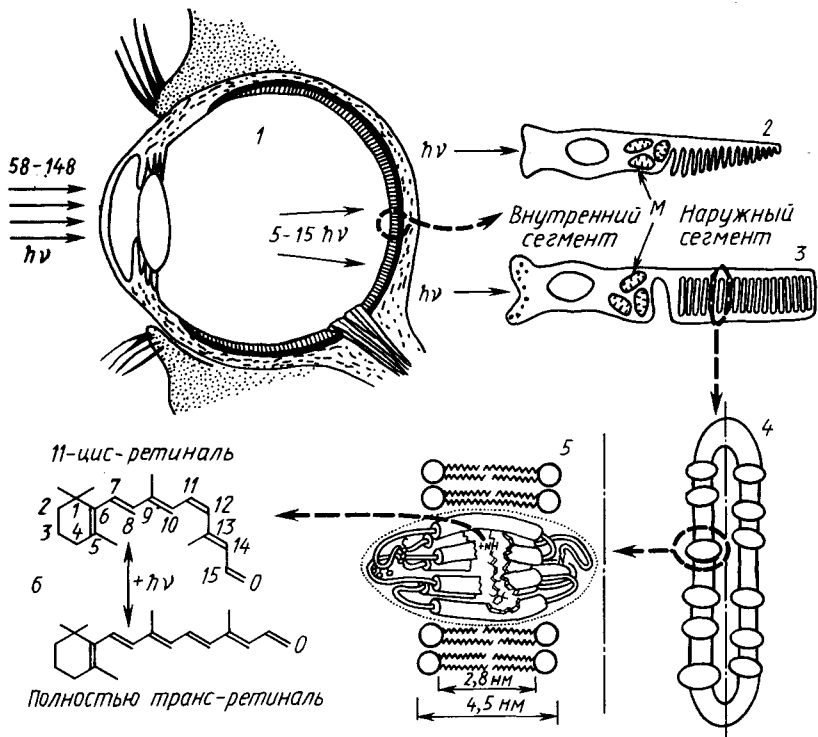


Рис. 8.1. Структура органа зрения:

1—разрез глаза; 2—колбочки; 3—палочки (М—скопление митохондрий); 4—диск наружного сегмента палочки, 5—фрагмент мембраны диска со встроеной в нее молекулой родопсина; 6—хроморфная группировка родопсина—ретиная в 11-*цис*- и полностью-*транс*-конформациях

палочках сетчатки, а остальные теряются. Около 4% света отражается от роговицы, около 50% поглощается оптическими средами глаза, а около 80—85% света, дошедшего до сетчатки, проходит сквозь нее и поглощается в клетках пигментного эпителия. Благодаря пигментному эпителию, подстилающему сетчатку, резко уменьшается количество отраженного и рассеянного от задней стенки глаза света и тем самым улучшается острота зрения. Так как в сетчатке содержится палочек 125 млн, все кванты при пороговой интенсивности (а их всего 15) поглощаются разными палочками.

Рассмотрим строение и функции палочек (рис. 8.1). Зрительный пигмент палочек родопсин сосредоточен в наружных сегментах палочек, где он встроен в зрительные диски. Диски представляют собой замкнутые бимолекулярные липидные мембраны, напоминающие собой расплюснутые воздушные шары, уложенные в стопку. Наружный сегмент соединен с внутренним сегментом тонкой соединительной ножкой. Во внутреннем сегменте рядом с

ножкой сосредоточено большое количество митохондрий, в нем же располагается ядро клетки. В конце внутреннего сегмента, повернутого к свету, находится синаптический контакт с нервным волокном.

Молекулы родопсина пронизывают липидный бислой мембран зрительных дисков. Хромофорная группа родопсина расположена так, что вектор дипольного момента электронного перехода оказывается параллельным плоскости дисков, т. е. перпендикулярным направлению движения падающих фотонов. При такой ориентации хромофоров вероятность поглощения фотонов максимальна. Для нормальной фоторецепции очень важно, чтобы молекулы пигмента могли совершать быструю латеральную диффузию и находились в очень «мягком» окружении в мембране, так как молекулы пигмента после поглощения фотона претерпевают значительные конформационные перестройки. Низкая вязкость липидного слоя обусловлена очень высоким (до 50%) содержанием полиненасыщенной докозагексеновой жирной кислоты (22:6—22 атома углерода, 6 ненасыщенных двойных связей). Однако по этой же причине в липидах мембран могут легко активироваться процессы пероксидного окисления, что, по-видимому, лежит в основе ряда заболеваний глаз.

Зрительный пигмент родопсин—сложный белок. Он состоит из гликопротеидной части—опсина и хромофорной группы—ретинальдегида, или просто ретиналя. Ретиналь может иметь несколько пространственных изомеров, например 9-*цис*-ретиналь, 11-*цис*-ретиналь, полностью-*транс*-ретиналь и др. Вся совокупность фотохимических превращений родопсина зиждется на двух фундаментальных явлениях. Во-первых, ретиналь под действием света способен переходить в различные *цис-транс*-изомеры, наиболее важные из которых (11-*цис*- и полностью-*транс*-ретиналь) изображены на рис. 8.1. Во-вторых, только одна из этих изомерных форм, а именно 11-*цис*-ретиналь, структурно соответствует центру связывания ретиналя на опсине и образует с ним прочный комплекс. Другие изомеры таким соответствием не обладают и комплекс хромофор—белок непрочен.

## 8.2. *цис-транс*-Фотоизомеризация ретиналя

Молекула ретиналя содержит длинную систему сопряженных двойных связей, а так как вращение вокруг двойной связи невозможно, то молекула хромофора—плоская. Поглощение света ретиналем приводит к  $\pi-\pi^*$ -электронному переходу. Напомним, что в органических молекулах  $\pi$ -орбитали (основное состояние) связывающие, а  $\pi^*$ -орбитали (электронно-возбужденное состояние) являются разрыхляющими (см. разд. 4.3). Поэтому после поглощения фотона  $\pi$ -связь разрывается и две части молекулы ретиналя поворачиваются вокруг  $\sigma$ -связи (рис. 8.2 и 8.3).

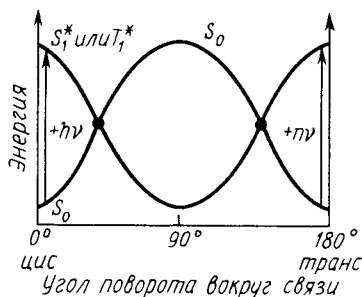


Рис. 8.2. Энергетическая диаграмма конформационных состояний ретиналя до поглощения света ( $S_0$ ) и после перехода в возбужденное состояние ( $S_1^*$  или  $T_1^*$ ):

черными точками показано вырождение возбужденного и основного энергетического состояний ретиналя

той пружине, легче перейти в ортогональное положение, чем к *транс*-форме. Соответственно, по стерическим причинам образование *транс*-формы более вероятно, чем *цис*-формы.

Это не означает, что освещение всегда приводит только к *цис-транс*-переходу, а не наоборот. Опыты Г. Уолда и сотр. свидетельствуют о фотообратимости изомеризации, зависящей от длины волны. Чтобы объяснить это явление, рассмотрим кинетику реакций. Пусть квантовый выход *цис-транс*-перехода равен  $\phi_{цт}$ , а квантовый выход обратной фотохимической реакции —  $\phi_{тц}$ . Если из электронно-возбужденного состояния происходит только *цис-транс*-изомеризация, а другие процессы отсутствуют, то  $\phi_{цт} + \phi_{тц} = 1$ . Скорость прямой реакции равна [см. (4.5)]:

$$\frac{d[цис]}{dt} = -I_0 s_4 \phi_{цт} [цис], \quad (8.1)$$

а скорость обратной

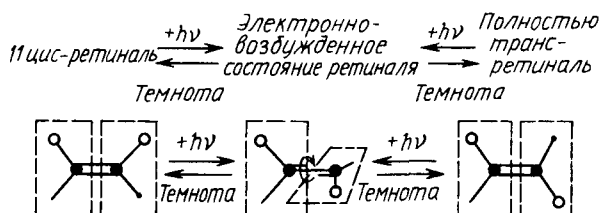


Рис. 8.3. *цис-транс*-Изомеризация ретиналя под действием света

$$\frac{d[\text{транс}]}{dt} = -I_0 s_m \Phi_{\text{му}} [\text{транс}], \quad (8.2)$$

где  $s_y$  и  $s_m$  — поперечные сечения поглощения соответственно *цис*- и *транс*-форм.

В стационарных условиях облучения устанавливается равновесное отношение концентраций *цис*- и *транс*-форм:

$$\frac{[\text{цис}]}{[\text{транс}]} = \frac{s_m \Phi_{\text{му}}}{s_y \Phi_{\text{ум}}}. \quad (8.3)$$

Из уравнения (8.3) видно, что соотношение *цис*- и *транс*-форм зависит не только от стерических условий образования обоих изомеров ( $\Phi_{\text{му}}/\Phi_{\text{ум}}$ ), но и от длины волны действующего света. В самом деле, при длинах волн, поглощаемых преимущественно *цис*-формой ( $s_y > s_m$ ), в стационарных условиях будет больше молекул в *транс*-форме. А при длинах волн, поглощаемых *транс*-формой ( $s_m > s_y$ ), образуется преимущественно *цис*-форма. При наличии многих взаимопревращающихся веществ накапливаться будет то, которое обладает наименьшим поглощением в спектральной области действующего света. Фотообратимость *цис-транс*-изомеризации имеет два важных следствия. Во-первых, под действием света не происходит полного перехода 11-*цис*- в полностью-*транс*-конформацию при любых интенсивностях действующего света. Во-вторых, реакции *транс*- → *цис*-фотоизомеризации играют важную роль в регенерации зрительного пигмента (см. ниже).

### 8.3. Фотопревращения родопсина

Единственной фотохимической реакцией, которая приводит к появлению ощущения света, в зрительном рецепторе является фотоизомеризация 11-*цис*-ретинала в полностью-*транс*-конформацию. После образования *транс*-формы стерическое соответствие хромофора и опсина нарушается, а это приводит к целой серии конформационных перестроек в молекуле белка, которые сопровождаются изменениями в спектре поглощения зрительного пигмента. Такие перестройки родопсина были впервые исследованы Г. Уолдом, получившим Нобелевскую премию в 1966 г. В опытах Г. Уолда родопсин выделяли в темноте, затем замораживали в жидком азоте (77 К) и облучали светом. При последующем нагревании образца до определенных температур наблюдались изменения спектров поглощения из-за последовательных переходов родопсина в его производные. На рис. 8.4 приведены эти формы, получившие специальные названия. На этом же рисунке приведены измеренные методом импульсного фотолиза времена конформационных превращений разных форм пигмента при комнатной температуре. При этом только переход родопсин — ба-

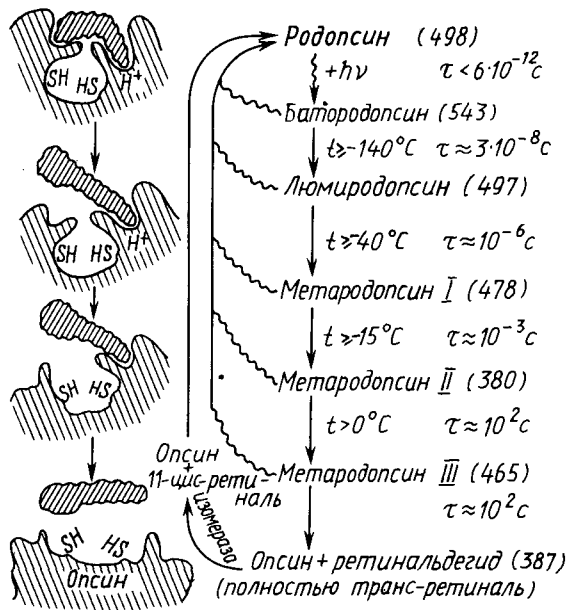


Рис. 8.4. Иницированные светом конформационные перестройки родопсина: рядом с названием конформомеров указана  $\lambda_{\max}$  (нм) спектров поглощения

роодопсин происходит под действием света, а остальные стадии осуществляются в темноте. При комнатной температуре длительность существования каждой последующей формы значительно больше, чем предыдущих. Каждый конформер содержит ретиналь в полностью *транс*-конформации и под действием квантов света может регенерировать непосредственно в родопсин. Вероятность такой регенерации возрастает с увеличением времени жизни конформера, так как увеличивается вероятность столкновения с ним квантов света. Видно, что метародопсин II со значительно большей вероятностью может на свету регенерировать в родопсин, чем метародопсин I, и т. д. Если родопсин осветить короткой вспышкой света и далее поместить в темноту, то возможность световой регенерации родопсина устраняется. В этом случае примерно через 100 с происходит распад родопсина на опсин и *транс*-ретиналь. Регенерация родопсина в такой ситуации будет происходить уже с участием ферментов. Фермент изомеразы переводит полностью *транс*-ретиналь в 11-*цис*-ретиналь, после чего происходит его присоединение к опсину с образованием родопсина. Но это путь медленный, поэтому на свету наибольшая часть фоторегенерирует и приведенная цепочка конформационных превращений чаще всего не доходит до конца.

### 8.4. Рецепторные потенциалы

Каким образом фотопревращения родопсина приводят к электрическому ответу рецепторной клетки? Ответ на этот вопрос позволяют дать данные, полученные методами отведения потенциалов и данные по конформационным превращениям родопсина, представленные на рис. 8.4. Регистрация электроретинограмм

(экстраклеточное отведение потенциалов от сетчатки) позволила получить рецепторные потенциалы, изображенные на рис. 8.5. Позднее аналогичные потенциалы непосредственно на цитоплазматической мембране палочек и колбочек были получены микроэлектродными методами. Сразу после освещения палочки короткой вспышкой света наблюдается продолжающийся  $\sim 1$  мс ранний рецепторный потенциал (РРП), амплитуда которого растет с увеличением интенсивности вспышки, но не превышает 5 мВ. Затем через  $\sim 1$  мс развивается поздний рецепторный потенциал (ПРП). Обращает на себя внимание несколько особенностей рецепторных потенциалов. Во-первых, в отличие от всех других известных клеток на цитоплазматической мембране наружных сегментов палочек потенциал имеет знак (+) внутри и знак (-) снаружи. Под действием света происходит развитие некоторого подобия потенциала нервных клеток, но с противоположным знаком. Во-вторых, индуцированный светом сигнал состоит из двух фаз: РРП и ПРП, природа которых совершенно различна. По-видимому, РРП связан с перемещением молекул родопсина во время конформационных перестроек, вызванных освещением. На молекуле этого белка имеются фиксированные заряды, положение которых относительно бислоя липидов после поглощения квантов света меняется, что и является причиной РРП. Следует подчеркнуть, что в возникновении РРП не участвуют никакие процессы изменения ионной проницаемости мембран. Если еще раз обратиться к рис. 8.4, то становится ясно, что за РРП ответственны конформационные превращения родопсина до стадии метародопсин II, так как именно они происходят за время, сравнимое с длительностью РРП. После образования метародопсина II начинаются процессы совершенно иной природы, в которых решающую роль играет диффузия медиаторов в клетки и движение ионов через клеточную мембрану.

Особенностью наружных сегментов палочек сетчатки является то, что в покое (в темноте) потенциал на их цитоплазматической мембране имеет натриевую природу, тогда как потенциал покоя нервных и многих других клеток имеет калиевую природу. Асимметрия распределения ионов в палочке по сравнению с внешней средой такая же, как и других клеток,— внутри мало натрия, но много калия. В наружных сегментах палочек в состоянии покоя коэффициент проницаемости для натрия превышает значения таких коэффициентов для других ионов. Вследствие возникновения электрохимического градиента внутрь движется

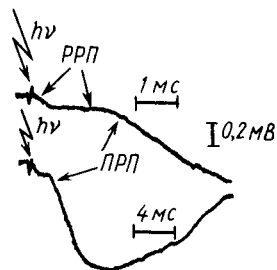


Рис. 8.5. Ранний рецепторный потенциал (РРП) и возникающий вслед за ним поздний рецепторный потенциал (ПРП): измерено методом электроретинографии на сетчатке кошки

постоянный поток ионов натрия. Натрий накапливается в цитоплазме наружного сегмента, а затем через ножку, соединяющую его с внутренним сегментом, пассивно диффундирует во внутренний сегмент. Здесь ионы натрия попадают в целую энергетическую фабрику (скопление митохондрий, изображенное на рис. 8.1), где, используя поставляемую митохондриями АТФ, работает фермент АТФ-аза, активно выкачивающий натрий во внешнюю среду. После того как из родопсина под действием света в зрительных дисках образуется метародопсин II, проницаемость цитоплазматической мембраны для натрия снижается. И большую роль начинает играть проницаемость для калия: развивается поздний рецепторный потенциал со знаком (-) внутри клетки.

Информация о фотовыцветании родопсина в дисках передается натриевым каналам в цитоплазматической мембране при помощи медиаторов. В. Хагинс (1971) выдвинул гипотезу, по которой в качестве медиаторов выступают ионы  $\text{Ca}^{2+}$ , так как добавление в суспензию палочек высоких концентраций  $\text{Ca}^{2+}$  вызывало такой же ответ, как освещение. Предполагалось, что  $\text{Ca}^{2+}$ , входя в клетки, закрывает  $\text{Na}^{2+}$ -каналы, индуцируя гиперполяризацию мембран. Позднее было обнаружено, что освещение палочек приводило к выходу  $\text{Ca}^{2+}$  из клеток, это объяснили тем, что освещение освобождает внутриклеточный связанный кальций, часть которого выходит наружу. Одновременно с кальциевой гипотезой возникла гипотеза о том, что медиаторами являются циклические нуклеотиды (М. В. Битенски и др.). Хотя биохимические данные давно свидетельствовали об активации светом каскада ферментативных реакций, приводящих к гидролизу цГМФ, однако сторонников последней гипотезы было мало, так как считалось, что ферментативные реакции слишком медленны, чтобы отвечать за быстрые фоторецепторные потенциалы. Ситуация усложнялась тем, что цГМФ и  $\text{Ca}^{2+}$  — взаимовлияющие медиаторы. Поэтому когда исследования проводят на целых клетках, очень трудно различить, какой из медиаторов непосредственно закрывает и открывает ионные каналы. В течение 14 лет кальциевая гипотеза доминировала в литературе, подтверждалась многими косвенными доказательствами, но ни одно из них не было однозначным и решающим.

Е. Е. Фесенко и сотр. (1985) использовали для выяснения природы медиаторов метод микроэлектродной техники, когда к кончику микроэлектрода присасывали небольшой фрагмент мембраны (patch) наружных сегментов палочек (НСП), отмытый от всех компонентов цитоплазмы. Тем самым были исключены все косвенные пути регуляции  $\text{Na}^{+}$ -каналов. В омывающий мембрану раствор добавляли с цитоплазматической стороны различные соединения. При этом выяснилось, что единственным высокоспецифическим соединением, изменяющим электрическую проводи-



мость мембран, является цГМФ, действующий в концентрации 10—30 мкМ, тогда как цАМФ, ГМФ и 2',3'-цГМФ не влияли даже при 1 мМ концентрации.  $\text{Ca}^{2+}$  в отсутствие цГМФ не влиял на электрическую проводимость. В присутствии цГМФ увеличение концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  от  $10^{-8}$  до  $10^{-3}$  М приводило к увеличению цГМФ-зависимого ответа НСП всего на 20—30%. Таким образом, было показано, что соединением, прямое воздействие которого на мембрану приводит к изменению ионных токов, является цГМФ, но не  $\text{Ca}^{2+}$ .

Ионные каналы, открываемые в присутствии цГМФ, характеризуются проводимостью 100—200 фСм, что соответствует данным микроэлектродных отведений на целой сетчатке. Роль ионов кальция, по мнению авторов, заключается в его влиянии на метаболизм или связывание в клетке цГМФ, хотя не исключено, что он наряду с цГМФ выполняет пока неизвестные функции молекулы трансмиттера (т. е. передатчика сигнала от зрительных дисков на цитоплазматическую мембрану).

Особенно важно в этих опытах, что механизм действия на каналы у цГМФ был прямым, не связанным с фосфорилированием белков, так как процесс осуществлялся на отмытых мембранах в отсутствие АТФ и добавление АТФ никак на него не влияло. Именно это прямое действие и обеспечивает быстроту светового ответа в зрительной клетке (менее 1 мс).

Следующий вопрос заключается в том, как регулируется концентрация цГМФ при освещении? Для объяснения регуляторной роли циклических нуклеотидов обычно привлекается механизм с участием синтезирующих и гидролизующих циклические нуклеотиды ферментов: для цГМФ такие ферменты называются гуанилатциклазой и фосфодиэстеразой соответственно. Однако Е. Е. Фесенко и сотр. (1986) обнаружили, что в основе процесса возбуждения могут лежать управляемые светом физические процессы сорбции—десорбции цГМФ без участия ферментов. Было показано, что наружные сегменты палочек связывают цГМФ при одновременном действии двух факторов—света и АТФ. Если к НСП, засвеченным в присутствии АТФ, т. е. связавших цГМФ, добавить ГТФ и снова осветить их, то цГМФ десорбируется. Эти наблюдения позволяют представить себе процесс развития электрофизиологического ответа (рецепторного потенциала) в ответ на освещение следующим образом. В темноте в клетке имеется свободная цГМФ и ионные каналы в цитоплазматической мембране открыты, мембранный потенциал имеет знак «плюс» внутри клетки.

При воздействии света в течение нескольких миллисекунд происходит АТФ-зависимое связывание цГМФ центрами, расположенными на мембранных структурах НСП. Так как число центров связывания в клетке превышает число молекул цГМФ, возможно полное связывание циклического нуклеотида и его исчезновение из

цитоплазмы. Это приводит к закрыванию каналов и развитию рецепторного потенциала. Затем на центрах связывания цГМФ начинается десорбция нуклеотида, зависящая от ГТФ, каналы открываются и восстанавливается мембранный потенциал, характерный для покоящейся (темновой) клетки (см. рис. 8.5).

## 8.5. Цветное зрение

При слабом свете максимум чувствительности глаза человека расположен около 500 нм, что соответствует максимуму поглощения родопсина, содержащегося в палочках. На ярком свете максимум чувствительности смещается к 550 нм, что соответствует максимуму спектра поглощения пигмента в наиболее распространенном типе колбочек. Пигмент колбочек содержит тот же самый 11-*цис*-ретиналь, как и родопсин, но белковая часть пигмента отличается, поэтому пигменты колбочек носят название *иодопсинов*.

Спектры поглощения зрительных пигментов можно измерять тремя способами: 1) зрительные пигменты экстрагируют из сетчатки мягкими детергентами и затем измеряют суммарный спектр поглощения всех пигментов; 2) проводят микроспектрофотометрию отдельных фоторецепторных клеток; 3) у интактных животных измеряют спектр отражения света от задней стенки глаза до и после засветки мощной вспышкой монохроматического света: последняя приводит к преимущественному выцветанию той формы пигмента, которая поглощает свет данной длины волны (например, после освещения ярким красным светом выцветает преимущественно красный пигмент и в спектре отражения мы его не увидим). Таким образом, можно исследовать спектр поглощения зрительных пигментов в неповрежденном глазу без всяких последствий для испытуемого. Данные разных методов дополняют друг друга.

При измерении спектров поглощения отдельных колбочек оказалось, что каждая колбочка содержит только один вид иодопсина, а типов колбочек всего три. Иодопсины человека имеют максимум поглощения при 445, 535 и 570 нм. Поглощение света иодопсинами приводит к появлению РРП в колбочках. Для того чтобы измерить спектр действия РРП, регистрируют вызываемые короткими вспышками яркого монохроматического света амплитуды РРП. В сетчатке карпа таким способом обнаружено три типа колбочек с максимумами спектров действия при 462, 529 и 611 нм (рис. 8.6).

При некоторых генетических заболеваниях нарушается синтез одного из белков иодопсинов, в результате чего не образуется соответствующий пигмент цветного зрения и человек утрачивает способность различать цвета. Эта болезнь называется дальтонизмом.

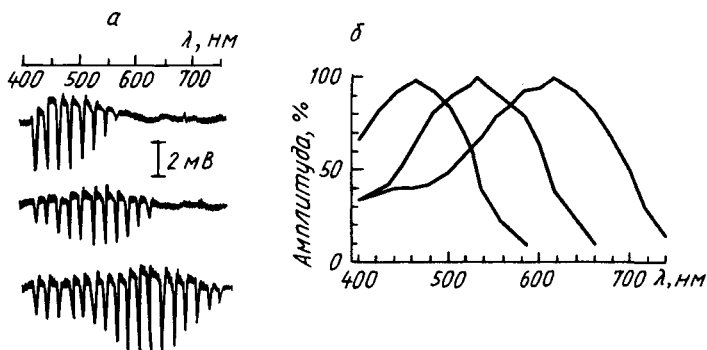


Рис. 8.6. Три типа колбочек в сетчатке глаза карпа: РРП, отводимые микроэлектродами от колбочек карпа, дают три типа спектров действия; *а* — вспышки, индуцировавшие РРП, длились 0,3 с, а последующий темновой период — 0,6 с, длину волны каждой последующей вспышки меняли на 20 нм, а интенсивность сохраняли постоянной; *б* — усредненные по многим измерениям спектры действия РРП трех видов колбочек

## 8.6. Фотоповреждение глаз

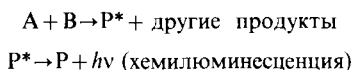
Роговица и хрусталик помимо того, что они ответственны за формирование изображения на сетчатке, выполняют также роль граничных светофильтров, пропускающих излучение с длинами волн более 300 и 400 нм соответственно. В обоих структурах при очень больших дозах УФ-облучения происходят фотохимические повреждения, выражающиеся в помутнении и воспалительных реакциях. В присутствии сенсibilизаторов фотоповреждения глаз резко усиливаются. Изучены эффекты фурукумаринов, используемых при фотохимиотерапии заболеваний кожи в виде таблеток (см. гл. 7). При этом часть сенсibilизатора, естественно, проникает в структуры глаза. УФА-облучение сенсibilизированных животных приводило к морфологически выраженным повреждениям роговицы, вещества внутренней камеры глаза, ирисовой диафрагмы и хрусталика (Р. Г. Фриман, 1966). В основе фотосенсibilизированного 8-МОП повреждения глаза лежат окислительные реакции с белками. С. Лерман и сотр. (1980) показали ковалентное нуждающееся в кислороде фотоприсоединение 8-МОП к белкам хрусталика человека — кристаллинам. При этом методом ЯМР обнаружено исчезновение протонов в 3-, 4-, 4'- и 5'-положениях 8-МОП, а также в  $C_2$ -положении индольного кольца и в алифатических  $\alpha$ -СН- и  $\beta$ -СН<sub>2</sub>-группах триптофана. Максимум спектра действия сенсibilизированного 8-МОП фотоповреждения глаз расположен ~320—340 нм, хвост спектра доходит до 380 нм. Больные, получающие ПУФА-терапию, во время УФА-облучения обязательно одевают светозащитные очки, чтобы избежать повреждения глаз. Им также в течение нескольких часов после

приема таблеток фурукумаринов нельзя находиться на прямом солнечном свете, содержащем большое количество УФА-излучения. Фотоповреждения хрусталика необратимы, так как поврежденные молекулы из него никогда не выводятся.

До сетчатки УФ-излучение не доходит, поэтому фурукумарины и другие фотосенсибилизаторы, поглощающие при  $\lambda < 400$  нм, не эффективны. Однако в клетках сетчатки осуществляются фотоповреждения под действием света, поглощенного хромофорной группой зрительных пигментов — ретиналем. Ретиналь, входящий в состав зрительных пигментов, очень быстро (см. рис. 8.4) растрчивает энергию электронного возбуждения в процессах *цис-транс-* и *транс-цис* (фоторегенерация родопсина)-изомеризации. В других фотохимических реакциях связанный с опсином ретиналь, по-видимому, практически не участвует. Однако не все молекулы родопсина после поглощения первого фотона успевают поглотить еще один фотон и фоторегенерировать. Часть молекул распадается на опсин и полностью *транс*-ретиналь. А. А. Красновский (мл.) и В. Е. Каган (1978) показали, что свободный ретиналь является на свету эффективным генератором синглетного кислорода. Квантовый выход интерконверсии свободного ретиналя высок; по данным разных авторов, он составляет 0,4—0,7. Максимумы спектров поглощения различных изомеров свободного ретиналя располагаются  $\sim 360$ —380 нм, длинноволновый хвост захватывает фиолетовую область видимого света. Поэтому фиолетовый свет вызывает генерацию триплетных возбужденных состояний ретиналя, что в свою очередь приводит к значительному окислительному повреждению мембран дисков рецепторных клеток. Субстратом окисления являются главным образом остатки полиненасыщенной жирной кислоты (22:6). В. Е. Каган и сотр. (1982) показали, что тушитель синглетного кислорода 1,4-диазабиперидин(2,2,2)октан, а также антиоксиданты  $\alpha$ -нафтол и 4-метил-2,6-дитретбутилфенол (ионол) с высокой эффективностью защищали клетки сетчатки от окислительного фотоповреждения, сенсibilизированного свободным ретиналем. Авторы предполагают, что ретиналь сенсibilизирует окисление компонентов мембран за счет генерации синглетного кислорода. Фотоповреждение мембран, сенсibilизированное ретиналем, — очень важный негативный эффект, лежащий в основе ожога глаз под действием видимого света. Для защиты глаз можно рекомендовать два способа: применять антиоксиданты, а также пользоваться светозащитными очками, не пропускающими фиолетовый и синий свет. Ношение синих очков (пропускающих синий свет) очень вредно для глаз, так как эти очки, ослабляя интегральный световой поток, стимулируют расширение зрачков. На сетчатку в результате попадает большое количество фиолетового света и сенсibilизируемый ретиналем ожог усиливается.

## ГЛАВА 9 ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ В БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ

Хемилюминесценцией (ХЛ) называют свечение, сопровождающее химические реакции. Наличие такого свечения означает, что энергия, которая выделяется на одной из стадий химического процесса, протекающего в системе, оказывается достаточной для образования одного из продуктов реакции в электронно-возбужденном состоянии:



Среди огромного разнообразия биохимических реакций, протекающих в живых организмах, лишь единичные сопровождаются измеримым излучением в видимой или ультрафиолетовой областях спектра. Наиболее изучены пять типов процессов, сопровождающихся свечением.

1. *Биолюминесценция* — яркое, видимое простым глазом свечение некоторых бактерий, простейших, ракообразных, червей, моллюсков, рыб. Хорошо известна биолюминесценция светлячков. Биолюминесценция обусловлена определенными ферментативными реакциями.

2. *Хемилюминесценция* в системах, содержащих активные формы кислорода: пероксид водорода, супероксидный и гидроксидный радикалы, синглетный кислород.

3. Хемилюминесценция, сопровождающая реакции ценного (свободнорадикального, пероксидного) окисления органических соединений. Основной вклад в слабую хемилюминесценцию (раньше ее называли *сверхслабым свечением*) тканей, гомогенатов, суспензий органелл, липосом и растворов полиненасыщенных жирных кислот дает свечение, сопровождающее пероксидное окисление липидов.

4. *Свечение* при реакциях свободных радикалов, образовавшихся при действии физических факторов: при облучении системы ионизирующей радиацией — *радиохемилюминесценция*; после облучения видимым или УФ-светом — *фотохемилюминесценция*; при пропускании электрического тока через растворы — *электрохемилюминесценция*; при воздействии ультразвука — *сонолюминесценция*; при перемешивании растворов — *триболюминесценция*.

5. При облучении (или освещении) веществ в твердой фазе (как частный случай — при облучении биологических объектов, суспензий или растворов, замороженных жидким азотом) свободные радикалы могут оказаться иммобилизованными. Их реакции и сопутствующая хемилюминесценция активируются при нагревании и размягчении матрицы. Такое свечение называют *термолюминесценцией*.

Изучение хемилюминесценции ведется в нескольких направлениях. Во-первых, само явление превращения энергии химической

реакции в энергию света представляет теоретический интерес для науки. Во-вторых, измерение хемиллюминесценции — удобный метод контроля за течением химических реакций, сопровождающихся свечением, и, следовательно, может использоваться для изучения кинетики и механизма реакций. Важно, что, как правило, хемиллюминесценция обусловлена реакциями между свободными радикалами. Тем самым, измеряя хемиллюминесценцию, мы изучаем реакции свободных радикалов, которые непросто исследовать химическими методами. В-третьих, измерение хемиллюминесценции оказалось в ряде случаев чувствительным аналитическим методом в химии и биохимии и может успешно использоваться в клинической диагностике.

Современные успехи как в изучении хемиллюминесценции, так и в использовании этого явления в других исследованиях были бы невозможны без разработки чувствительных методов регистрации обычно весьма слабых свечений, сопровождающих химические реакции. Лучшие образцы современных фотоумножителей, работающих в одноэлектронном режиме, без всякого охлаждения обладают достаточно низкими темновыми шумами и высокой чувствительностью, позволяющей регистрировать свечение в большинстве систем, представляющих интерес.

### 9.1. Молекулярные механизмы образования возбужденных молекул при хемиллюминесценции. Рекомбинационное свечение

Весьма простая фотохимическая реакция, известная для биомолекул, — это фотоионизация органического соединения, например тирозина или триптофана (см. разд. 5.3), под действием ультрафиолетовых фотонов. Этот процесс происходит через синглетное возбужденное состояние молекулы и сопровождается захватом электрона молекулами растворителя:



где АН — молекула;  $\cdot\text{АН}^+$  — катион-радикал;  $e^-$  — сольватированный электрон. При температуре жидкого азота (77К) сольватированные электроны захватываются ловушками в замороженном растворителе и становятся более устойчивыми.

Схему электронных энергетических уровней фотопродуктов можно представить, как показано на рис. 9.1. Правильность этой схемы доказывают результаты изучения термо- и фотоиндуцированной люминесценции таких замороженных образцов.

При небольшом нагревании (77—90 К) наблюдается фосфоресценция молекулы аминокислоты, а флуоресценция полностью отсутствует:



Сам факт, что свечение активируется при нагревании  $E_a$ , свидетельствует о том, что основной энергетический уровень сольватированного электрона лежит ниже триплетного уровня молекулы. Переход сольватированного электрона на  $S_1$  уровень требует большей энергии активации и менее вероятен уже по одной этой причине. Никаких других причин того, что  $e^-$  переходит на уровень  $T_1$ , а не на уровень  $S_1$ , вероятно, нет. Отсутствие дополнительных (кроме энергетических) ограничений доказывается следующим опытом.

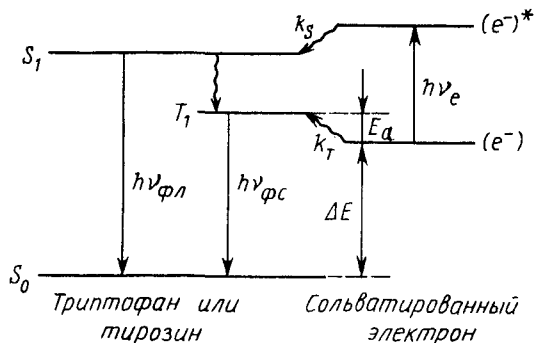
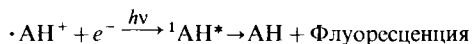


Рис. 9.1. Схема электронных уровней и электронных переходов в ароматических аминокислотах, облученных при 77 К УФ-радиацией:

$S_0$  — аминокислота в основном состоянии (в тексте АН);  $S_1$  — в возбужденном синглетном состоянии ( $^1\text{АН}^*$ );  $T_1$  — в триплетном состоянии ( $^3\text{АН}^*$ );  $e^-$  и  $e^{-*}$  — сольватированный электрон в основном и возбужденном состоянии, переход  $e^- \rightarrow e^{-*}$  происходит при поглощении кванта красного света (600 нм); разница в энергии уровней  $e^-$  и  $T_1$  равна энергии активации термолюминесценции (в тексте  $E_a$ ), разница в энергии уровней  $e^-$  и  $S_0$  равна  $\Delta E$  (см. текст)

Сольватированный электрон имеет широкую полосу поглощения в красной области спектра с максимумом  $\sim 600$  нм. Освещение системы в области поглощения сольватированного электрона приводит к его попаданию на уровень  $S_1$  молекулы (рис. 9.1). Об этом говорит факт фотоиндуцированной красным светом ультрафиолетовой (антистоксовской) флуоресценции ароматических аминокислот при поглощении света сольватированным электроном



Естественно, что при этом появляется также и фосфоресценция молекул



Но соотношение интенсивностей флуоресценции и фосфоресценции наблюдалось такое же, как при оптическом возбуждении в полосе поглощения молекул аминокислот.

Свечение при взаимодействии сольватированных электронов с катион-радикалами аминокислот может рассматриваться как простейшая модель хемилюминесцентной реакции при термическом возбуждении. Эта модель содержит несколько существенных черт, вероятно имеющих место и в других случаях.

1. Возбужденное состояние возникает при рекомбинации предварительно разделенных зарядов, причем перенос электрона к акцептору происходит не на основной, а на возбужденный уровень акцептора, который после этого становится эмиттером излучения.

2. Энергия излучаемого фотона ( $T_1 \rightarrow S_0 + h\nu$ ) может превышать среднюю энергию, выделяющуюся при химической реакции ( $\Delta E$  на рис. 9.1), на величину энергии активации  $E_a$  (рис. 9.1) реакции, сопровождающейся свечением

$$h\nu = \Delta E + E_a.$$

Заметим, что впервые это правило сформулировал Р. Одюбер (1935).

3. Более вероятна хемилюминесценция с триплетного уровня эмиттера, чем с синглетного, по причинам чисто энергетического характера.

При биохимических реакциях непосредственного взаимодействия свободного радикала с сольватированным электроном не бывает, поскольку сольватированные электроны при таких процессах, по-видимому, никогда не образуются. Хемилюминесценция связана чаще всего с взаимодействием двух свободных радикалов. Самая простая из такого рода реакций была описана М. Геркулесом (1964)—это реакция между катион- и анион-радикалами, которые образуются при электролизе органических соединений в органическом же электролите. Например, в растворе антрацена или его производных (молекулы которых мы обозначим как АН) у анода происходит окисление молекул и образование катион-радикалов:



а у катода имеет место восстановление молекул и образование анион-радикалов:



При перемешивании раствора, где происходит такой электролиз, наблюдается яркое свечение, которое, надо полагать, объясняется взаимодействием катион- и анион-радикалов:



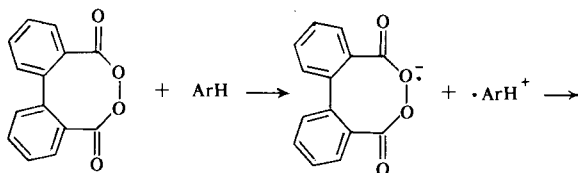
## 9.2. Механизм некоторых хемилюминесцентных реакций в растворах

Образование возбужденных молекул при химических реакциях протекает через ряд нестабильных промежуточных про-

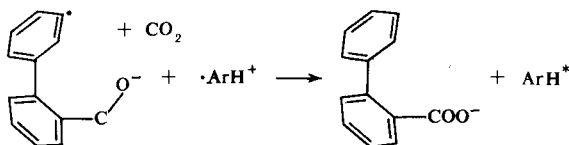


дуктов, благодаря чему выяснение механизма этих процессов представляет большие трудности; полной уверенности в точности всех стадий, по-видимому, нет пока ни в одном случае. Тем не менее полезно привести схему некоторых из этих реакций.

Сравнительно прост механизм образования возбужденной молекулы полициклического ароматического углеводорода — рубрена при разложении органического пероксида (см. схему). Вначале, согласно Дж. Ку и Г. Б. Шустеру, происходит межмолекулярный перенос электрона и образование катион-радикала рубрена ( $\cdot\text{ArH}^+$ ):



Анион-радикал пероксида, образующийся в первой реакции, неустойчив и распадается с выделением  $\text{CO}_2$ :

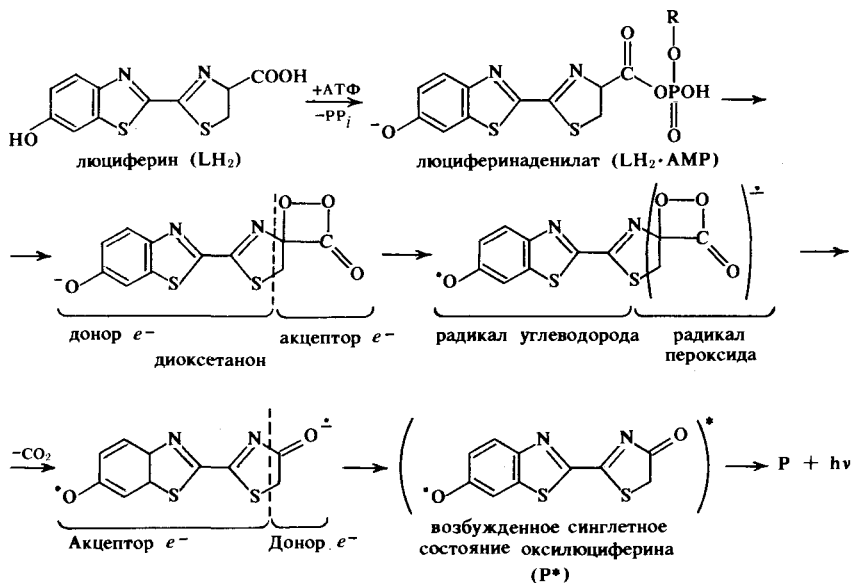


Образующийся новый радикал — анион-радикал бензокумарина — отдает назад электрон катион-радикалу рубрена, при этом образуется не основное, а возбужденное состояние рубрена, что сопровождается высвечиванием кванта света (выход люминесценции рубрена близок к единице):

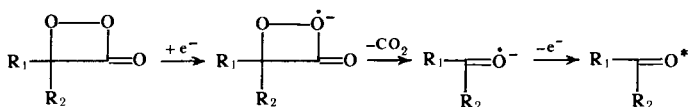


Нетрудно видеть в механизме этого процесса нечто общее с рассмотренными выше модельными системами: происходит разделение зарядов с образованием катион- и анион-радикалов, а затем, после химической реакции, сопровождающейся накоплением энергии, происходит обратный перенос электрона, но не на основную, а уже на вышележащую электронную орбиталь с образованием возбужденной молекулы.

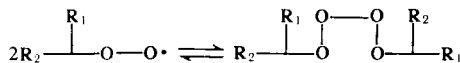
Нечто сходное имеет место и в гораздо более сложном процессе биолюминесценции: главная хемилюминесцентная реакция, которая заключается в образовании возбужденной молекулы люциферина, катализируемом ферментом люциферазой. Приводим схему реакций для люциферина светляка:



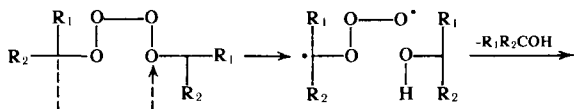
Можно видеть, что и тут происходит разделение зарядов, но уже в пределах одной молекулы, затем химическая реакция разложения диоксетановой группы, сопровождающаяся отщеплением CO<sub>2</sub>, и обратное взаимодействие групп, содержащих неспаренные электроны, с образованием возбужденной молекулы:



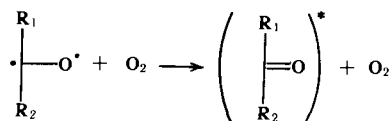
Наиболее распространенная реакция, сопровождающаяся хемилюминесценцией в клетках и тканях животных и человека,—это реакция пероксидного окисления липидов, которая представляет собой лишь частный случай реакций цепного окисления органических соединений молекулярным кислородом. Доказано, что возбужденные молекулы образуются в реакции взаимодействия двух пероксидных радикалов. При этом сначала образуется тетроксид:



Затем происходит связанное с развитием механического напряжения в скелете молекулы образование спирта и бирадикала:



Эту стадию мы можем рассматривать как момент разделения электронов в молекуле. Последующая химическая стадия приводит к выделению молекулы кислорода и образованию кетона в триплетном возбужденном состоянии (Р. Ф. Васильев):



Таким образом, в реакциях, сопровождающихся образованием возбужденных состояний молекул, прослеживаются общие черты: вначале происходит запасание энергии, например в результате энергичного окисления, в молекуле. Затем происходит разделение зарядов: перенос электрона между молекулами или между группами в одной молекуле. Далее следует внутримолекулярная перестройка: обычно это расщепление связи и выделение  $CO_2$ ,  $O_2$  или (в других реакциях, здесь не рассмотренных)  $N_2$ . Наконец, происходит возвращение электрона, но не на самую нижнюю, а на более высокую орбиталь (образование возбужденной молекулы).

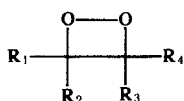
Механизм многих реакций, которые сопровождаются хемиллюминесценцией, еще окончательно не установлен. Поэтому небесспорны и вопросы классификации процессов хемиллюминесценции. Согласно одной из них все хемиллюминесцентные реакции можно разделить на реакции с переносом электрона, реакции с образованием синглетного кислорода и реакции разложения пероксидов (Дж. Барлтон, Дж. Койл, 1978). Но на примере хемиллюминесценции при цепном окислении органических веществ можно убедиться, что процесс включает в себя внутримолекулярный перенос электрона и разложение пероксида (с выделением молекулы кислорода); кроме того, в этой реакции показано образование наряду с молекулами возбужденного кетона молекул кислорода в синглетном (возбужденном) состоянии (Р. Ф. Васильев, 1963). Поэтому в разд. 9.4—9.7 сгруппированы реакции хемиллюминесценции не в соответствии с их механизмом, а по критерию использования данного хемиллюминесцентного метода в аналитических целях в биологии и медицине.

### 9.3. Изучение механизма хемиллюминесцентных реакций.

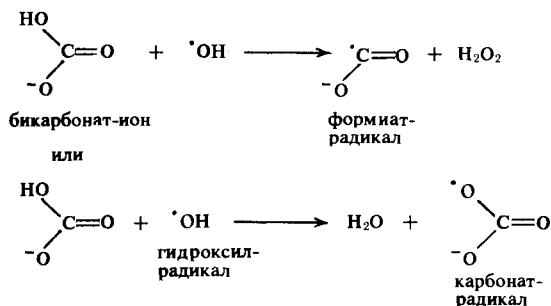
#### Свойства молекул продуктов, образующихся в возбужденном состоянии

Первой задачей при изучении механизма процесса хемиллюминесценции, безусловно, можно считать выявление хемиллюминесцентной реакции, т. е. того элементарного химического процесса, который сопровождается высвечиванием кванта света. Чаще всего процесс, поначалу казавшийся элементарным, состоит в действительности из ряда стадий, последовательность которых выяв-

ляется по мере исследования. Общего рецепта нет, но один важный вывод заключается в том, что свечение связано либо с рекомбинацией свободных радикалов, либо с химическими превращениями циклического пероксидного продукта типа диоксетана:



Определение того, взаимодействие каких именно радикалов может привести к хемилюминесценции в биологических системах,—задача не из легких. Использование метода ЭПР для этих целей ограничено относительно низкой чувствительностью метода по сравнению с методом хемилюминесценции, но в замороженных образцах измерение сигналов свободных радикалов все же возможно. В качестве примера сочетания метода ЭПР и хемилюминесценции рассмотрим работу, в которой выяснялось, какие радикалы ответственны за хемилюминесценцию в системе, где генерируются супероксидные радикалы. Р. Штауфф обнаружил, что хемилюминесценция резко усиливается в присутствии диоксида углерода. Было сделано предположение, что хемилюминесценция связана с образованием формильного или же карбонильного свободных радикалов:

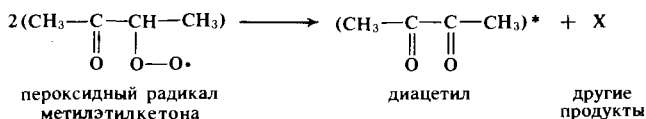


Чтобы выяснить, какие из этих двух типов радикалов могут давать хемилюминесценцию при взаимодействии, был поставлен опыт, схема которого дана на рис. 9.2. Растворы муравьиной кислоты или соды замораживали жидким азотом и подвергали ультрафиолетовому облучению при 77 К. Затем при той же температуре измеряли спектры ЭПР радикалов. Осторожно нагревая образец, регистрировали свечение (термолюминесценцию). Затем образец опять охлаждали до температуры кипения жидкого азота (77 К) и вновь измеряли спектры ЭПР. Между количеством ( $\Delta m$ ) исчезнувших свободных радикалов (что регистрируется по уменьшению в результате нагревания сигнала ЭПР

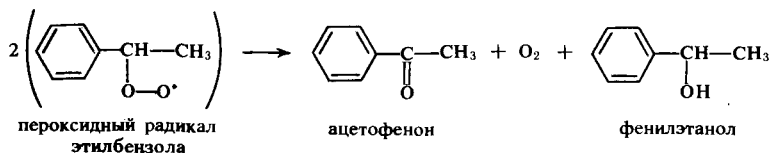


сценции, сопровождающей цепное (пероксидное) окисление углеводородов. Данные о теплоте отдельных реакций при цепном окислении позволяют думать, что за свечение ответственны реакции взаимодействия свободных радикалов, так как только при этих реакциях выделяется достаточно энергии, чтобы образовались возбужденные молекулы. Измерение кинетики процессов, сопровождающихся хемилюминесценцией (Р. Ф. Васильев, О. Н. Карпунин и В. Я. Шляпинтох), показало, что свечение вызвано реакцией взаимодействия пероксидных радикалов  $ROO\cdot + ROO\cdot$  (см. разд. 9.2). Подтверждение этих предположений и выяснение продуктов реакции, молекулы которых образуются в возбужденном состоянии, потребовало изучения свойств возбужденных молекул: спектра испускания, времени жизни возбужденного состояния, квантового выхода люминесценции.

Измерение спектров хемилюминесценции, как правило,—исключительно трудная задача вследствие низкой интенсивности свечения. Для измерения спектров хемилюминесценции при цепном окислении углеводородов Р. Ф. Васильевым и сотр. был использован специально разработанный весьма светосильный монохроматор с относительным отверстием 1:2, детектором излучения служил фотоумножитель, охлаждаемый твердой углекислотой и работающий в режиме счетчика фотонов. Спектры хемилюминесценции при окислении разных веществ лежали в одной спектральной области (420—520 нм), но различались по положению максимумов. Во всех случаях они соответствовали спектрам низкотемпературной фотолюминесценции кетонов, которые могли быть продуктами реакции пероксидных радикалов. Так, например, в случае окисления метилэтилкетона спектр хемилюминесценции по положению максимума и форме кривой был практически идентичен спектру низкотемпературной люминесценции диацетила, образующегося в реакции



Спектр хемилюминесценции при окислении этилбензола был близок к спектру фотолюминесценции ацетофенона:



Следует отметить, что измерение спектров хемилюминесценции с помощью монохроматора и чувствительного детектора удастся осуществить только при относительно интенсивной хемилюминес-

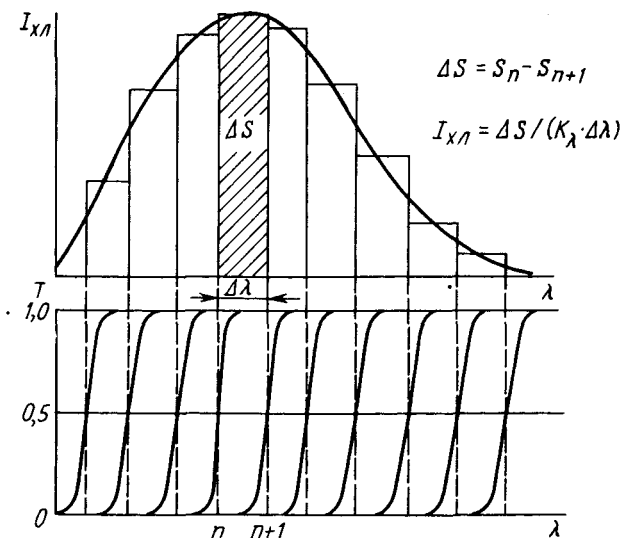


Рис. 9.3. Схема измерения спектров хемиллюминесценции с помощью серии граничных светофильтров: вверху — зоны, на которые разбивается спектр хемиллюминесценции (огнивающая кривая) с помощью светофильтров;  $I_{x\lambda}$  — интенсивность хемиллюминесценции при данной длине волны  $\lambda$ ;  $\Delta S$  — светосумма, соответствующая спектральному интервалу  $\Delta\lambda$ ; внизу — коротковолновые границы пропускания светофильтров,  $T$  — пропускание;  $n$  — порядковый номер светофильтра слева направо

сценции. В биологических системах, например при пероксидном окислении липидов мембранных структур клеток, свечение имеет настолько низкую интенсивность, что измерить спектр таким способом не удастся: слишком велики потери света при выделении из общего спектра узкой полосы, при фокусировке излучения и т. д. Не удастся обычно измерить спектр слабой хемиллюминесценции и с помощью интерференционных светофильтров, которые тоже пропускают слишком мало света. Поэтому спектры слабой хемиллюминесценции, хотя и грубые, получают, используя серию светофильтров с крутой коротковолновой границей пропускания (граничные светофильтры), т. е. светофильтры серий ЖС, ОС и КС. Длинноволновые границы пропускания этих светофильтров лежат за пределами области чувствительности приемников света — фотоумножителей. Принцип измерения спектров хемиллюминесценции с помощью таких граничных фильтров показан на рис. 9.3. Точка перегиба (50% пропускания) на кривых пропускания считается коротковолновой границей  $\lambda_n$  пропускания данного светофильтра  $n$ . Световой поток хемиллюминесценции  $S_n$ , пропускаемой светофильтром  $n$ , измеряется прибором. Затем при тех же условиях проведения хемиллюминесцентной реакции измеряется

световой поток хемиллюминесценции, пропускаемой светофильтром  $n+1$  ( $\lambda_n < \lambda_{n+1}$ ). Разность  $\Delta S = S_n - S_{n+1}$  зависит от чувствительности ФЭУ в спектральной области  $\lambda_n - \lambda_{n+1}$ , которую обозначим  $K_\lambda$ , где  $\lambda = (\lambda_n + \lambda_{n+1})/2$ ; от ширины спектрального диапазона  $\Delta\lambda = \lambda_{n+1} - \lambda_n$ ; от средней интенсивности  $I_\lambda$  хемиллюминесценции в диапазоне  $\Delta\lambda$ :

$$\Delta S = K_\lambda \cdot \Delta\lambda I_\lambda,$$

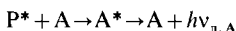
откуда

$$I_\lambda = \Delta S / (K_\lambda \Delta\lambda).$$

Используя измеренные величины  $\Delta S$ ,  $\lambda$  и взятые из справочника величины  $K_\lambda$ , рассчитаем  $I_\lambda$ . Полученный спектр  $I_\lambda = f(\lambda)$  выглядит как гистограмма (см. рис. 9.3, вверху). Истинный, плавный спектр соответствует обводящей этого столбчатого графика.

Перейдем к определению второй характеристики хемиллюминесценции: квантовому выходу. Хемиллюминесценция обусловлена образованием возбужденных молекул одного из продуктов реакции, который называют *эмиттером*. Не все молекулы эмиттера образуются в возбужденном состоянии, а только определенная часть —  $\eta_{\text{в}}$ , которую называют *квантовым выходом возбуждения*. Из числа возбужденных молекул, в свою очередь, только определенная часть будет переходить в основное состояние с испусканием кванта света — хемиллюминесценцию. Эта величина  $\phi_{\text{л}}$  есть вероятность излучательного перехода в молекуле эмиттера и равна квантовому выходу люминесценции эмиттера при фотовозбуждении. Произведение  $\eta_{\text{в}} \phi_{\text{л}}$  обозначим  $\eta_{\text{хл}}$  и назовем *квантовым выходом хемиллюминесценции*, оно равно отношению числа высвеченных фотонов к числу образовавшихся молекул эмиттера.

Характеристикой свойств возбужденных молекул продукта хемиллюминесцентной реакции (эмиттера) служит квантовый выход люминесценции  $\phi_{\text{л}}$ , определенный при измерении хемиллюминесценции. Для процессов окисления углеводов квантовый выход был оценен в работах Р. Ф. Васильева и А. А. Вичутинского (1965) с помощью активации хемиллюминесценции люминофорами. Явление активации заключается в том, что добавление к раствору окисляющегося углеводорода (например, циклогексана или этилбензола) небольшого количества люминесцирующего активатора (использовался дибромантрацен) приводило к увеличению интенсивности свечения, изменению спектра и подавлению тушащего действия кислорода в результате передачи энергии возбужденного состояния от молекулы продукта на активатор А:



По мере увеличения концентрации активатора интенсивность его люминесценции стремится к некоторому пределу, который



будет достигнут, когда все возбужденные молекулы продукта передадут свою энергию молекулам активатора. Отношение интенсивности свечения при этом ( $I_A$ ) к интенсивности свечения без активатора ( $I_P$ ) с учетом чувствительности аппаратуры к спектрам свечения равно:

$$\frac{I_A}{I_P} = \frac{\Phi_A}{\Phi_P},$$

где  $\Phi_A$  — квантовый выход люминесценции активатора;  $\Phi_P$  — квантовый выход люминесценции продукта. Зная  $I_A/I_P$  и  $\Phi_A$  (из данных по измерению фотолюминесценции), можно найти  $\Phi_P$ , который в данном случае оказался равным  $\Phi_P = 10^{-4} - 10^{-3}$  (Р. Ф. Васильев и сотр., 1965).

Важная характеристика молекул в возбужденном состоянии — время жизни  $\tau$ ; знание этой величины позволяет, в частности, выяснить, является ли возбужденное состояние синглетным ( $\tau_0 = 10^{-8} - 10^{-9}$  с) или триплетным ( $\tau_0 \geq 10^{-4}$  с). Прямое измерение  $\tau$  по затуханию свечения, как в случае фотолюминесценции, при исследовании хемилюминесценции, очевидно, невозможно. Для изучения  $\tau$  возбужденных молекул продуктов, образующихся при цепном окислении углеводов, был использован косвенный метод, основанный на эффекте тушения хемилюминесценции кислородом. Было обнаружено, что если проводить окисление углеводорода при постоянной скорости инициирования, скорость самого цепного процесса (оцениваемая, в частности, по скорости потребления кислорода) постоянна до практически полного исчерпания кислорода в среде. В замкнутом сосуде концентрация кислорода будет уменьшаться при этом линейно со временем (рис. 9.4). Оказалось, что интенсивность свечения при этом растет. Так как скорость окисления и, значит, стационарная концентрация возбужденных молекул про-

дуктов реакции постоянны,  $[O_2]$  рост хемилюминесценции можно объяснить лишь тем, что с уменьшением концентрации кислорода его тушащее действие на возбужденные молекулы снижается. Отложив интенсивность свечения  $I$  как функцию концентрации кислорода в каждый данный момент времени в координатах Штерна — Фольмера, получаем прямую, наклон которой позволяет определить произведение константы  $k_3$  взаимодействия кислорода с

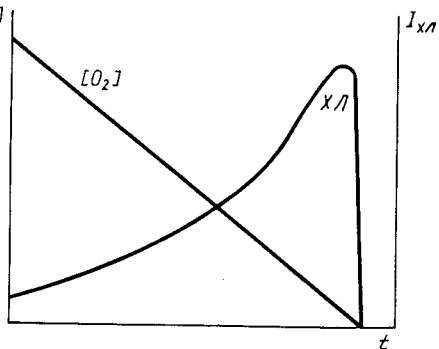


Рис. 9.4. Тушение хемилюминесценции кислородом: скорость процесса инициирования постоянна

возбужденными молекулами на время жизни  $\tau$  возбужденного состояния продукта в отсутствие тушения (2.32):

$$I/I_{O_2} = \eta/\eta_{O_2} = 1 + k_3\tau[O_2].$$

Это произведение  $k_3\tau$  было равно  $2 \cdot 10^3$  л/моль. Величина  $k_3$  может быть принята равной константе тушения кислородом фотолюминесценции различных люминесцирующих соединений в таком же растворителе и при той же температуре. Так, для тушения флуоресценции ароматических углеводов  $k_3 = 10^{10}$  л·моль<sup>-1</sup>·с<sup>-1</sup>, а для тушения фосфоресценции тех же соединений —  $k_3 = 4 \cdot 10^9 - 5 \cdot 10^9$  л/моль<sup>-1</sup>·с<sup>-1</sup>. Отсюда  $\tau = 2 \cdot 10^{-7}$  с (если продукт находится в синглетном состоянии) или  $\tau = 5 \cdot 10^{-7}$  с (если продукт находится в триплетном состоянии).

Зная  $\tau$  и квантовый выход излучательного перехода в возбужденной молекуле  $\phi_n$ , легко подсчитать излучательное время жизни возбужденного состояния по уравнению (2.33):

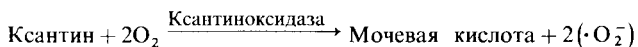
$$\tau_0 = \tau/\phi_n = 10^{-2} - 10^{-3} \text{ с.}$$

Итак, для молекул-эмиттеров хемилюминесценции оказалось, что  $\tau_0 = 10^{-2} - 10^{-3}$  с;  $\phi_n = 10^{-4} - 10^{-3}$ ; спектры совпадают со спектрами фосфоресценции возбужденных молекул кетонов, образующихся при диспропорционировании пероксид-радикалов. Таким образом, ясно, что кетоны, образующиеся в триплетном состоянии, и есть эмиттеры хемилюминесценции, а выход свечения  $\phi_n$  низок из-за тушения триплетных состояний при температуре реакции, включая тушение кислородом ( $\phi_{O_2} < \phi$ ).

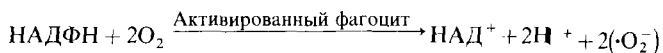
#### 9.4. Хемилюминесценция, сопровождающая образование активных форм кислорода

Активными формами кислорода называют свободные кислородсодержащие радикалы:  $\cdot O_2^-$  — супероксидный радикал,  $HO_2 \cdot$  — гидропероксидный радикал,  $\cdot OH$  — радикал гидроксила, а также пероксид водорода  $H_2O_2$ .

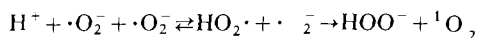
Супероксидные радикалы образуются при окислении некоторых субстратов молекулярным кислородом. Так, например, в коровьем молоке содержится фермент ксантиноксидаза, окисляющий ксантин кислородом с образованием супероксида:



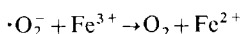
Мембраны фагоцитирующих клеток: тканевых макрофагов, моноцитов и гранулоцитов крови, содержат ферментативный комплекс: НАДФН-оксидазу, которая окисляет НАДФН до НАДФ<sup>+</sup>, при этом также происходит, одноэлектронное восстановление молекулярного кислорода (диоксигена) до супероксид-радикала:



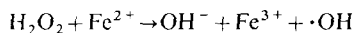
В водных растворах происходит переход супероксидных радикалов в гидропероксидные и дисмутация с образованием пероксида водорода и синглетного кислорода:



Хотя супероксидные радикалы не являются высоко реакционноспособными соединениями, появление этих радикалов в биологической среде (в плазме крови или межклеточной жидкости) может привести к восстановлению до двухвалентного состояния депонированных ионов  $\text{Fe}^{3+}$ :

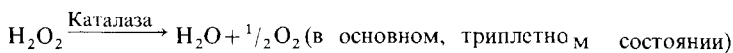


Ионы двухвалентного железа очень токсичны благодаря их способности разветвлять цепные реакции пероксидного окисления липидов (см. разделы 5.4 и 9.6) и разлагать  $\text{H}_2\text{O}_2$  с образованием весьма агрессивного свободного радикала гидроксила:

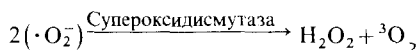


Гидроксильный радикал повреждает нуклеиновые кислоты, обладая как мутагенным, так и летальным действием на клетки, инициирует реакции пероксидного окисления липидов, инактивирует ферменты, одним словом обладает сильнейшим цитотоксическим действием.

Реакция образования радикалов  $\cdot\text{OH}$  подавляется ферментом каталазой, разлагающей  $\text{H}_2\text{O}_2$  нерадикальным путем:

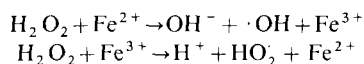


Образование гидроксильных радикалов угнетается также супероксиддисмутазой (СОД), так как этот фермент снижает концентрацию супероксидных радикалов в среде и тем самым подавляет образование ионов двухвалентного железа:



Существенно, что при диспропорционировании супероксидных радикалов, катализируемом СОД, образуется не «агрессивный» синглетный кислород, а обычный, триплетный.

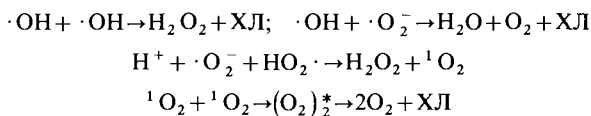
Модельной системой, часто используемой для изучения активных форм кислорода, может служить реактив Фентона: смесь  $\text{H}_2\text{O}_2$  с раствором соли двухвалентного железа (в каталитических количествах):



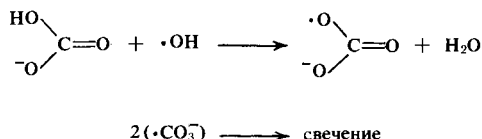
Таким образом, в реактиве Фентона содержатся все активные формы кислорода: свободные радикалы супероксида, гидроксила, пероксида водорода, а также синглетный кислород, образующийся при спонтанном диспропорционировании супероксидных радикалов.

Все системы, в которых генерируется активный кислород: ксантин+ксантиноксидаза, активированные фагоциты, реактив Фентона, обладают слабой, но измеримой хемилюминесценцией. О ее механизме, однако, имеются разные мнения.

И. Штауфф и сотр. на основании измерения спектров свечения при реакциях, сопровождающихся образованием кислородных радикалов, предположили, что при рекомбинации радикалов образуются возбужденные димеры кислорода  $(O_2)_2^*$ , обладающие эмиссией в области 480, 535 и 580 нм:

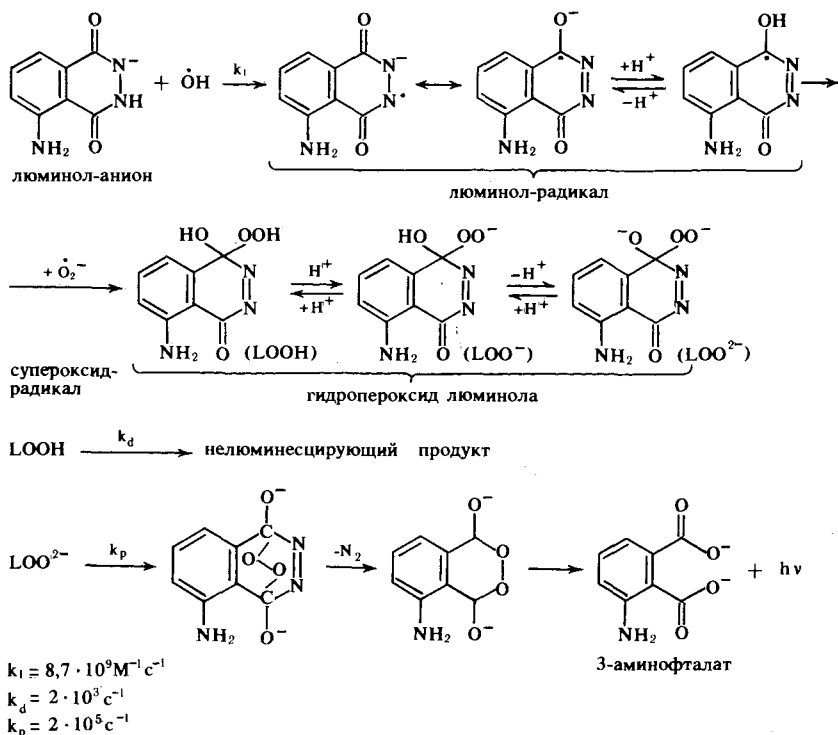


В биологических системах большую роль несомненно играют химические реакции с участием различных органических соединений, даже если они присутствуют в виде небольших примесей. Например, в присутствии растворенных карбонатов (из углекислоты воздуха) могут, по-видимому, образовываться карбонат-радикалы, рекомбинация которых сопровождается хемилюминесценцией (см. разд. 9.3):



В результате хемилюминесценция в такой системе, как ксантин+ксантиноксидаза, существенно усиливается в присутствии углекислоты или ее анионов. Точно так же без использования активаторов хемилюминесценция очень слабым оказывается свечение активированных тканевых макрофагов—клеток, которые выделяют супероксидные радикалы в ответ на действие различных стимуляторов.

Низкая интенсивность свечения при реакциях, сопровождающих образование активированного кислорода, и сильная зависимость интенсивности свечения от случайных примесей заставляют использовать для уверенного обнаружения кислородных радикалов в биологических системах химические активаторы хемилюминесценции, из которых наиболее известен 3-аминофталевый гидразид—люминол:



Люминол вступает в прямое химическое взаимодействие с радикалами  $\cdot\text{OH}$  и  $\cdot\text{O}_2^-$  и, строго говоря, является не активатором свечения, а участником химических реакций. В присутствии  $\cdot\text{OH}$  радикалов образуется свободный радикал люминола, который затем вступает в реакцию с супероксидным радикалом, образуя пероксидный радикал. В результате ряда внутримолекулярных перестроек образуется 3-аминофталат в возбужденном электронном состоянии, переход которого в основное состояние сопровождается испусканием кванта света.

Образование радикала люминола и последующие реакции, сопровождающиеся хемилюминесценцией, могут инициироваться не только гидроксильным радикалом, но, по-видимому, и другими радикалами. В частности, отмечалось, что интенсивность хемилюминесценции люминола, добавленного к системе, где генерируются гидроксильные и супероксидные радикалы (например, к системе ксантин — ксантинооксидаза), усиливается в присутствии углекислоты. Возможно, что это обусловлено участием в процессе промежуточного карбонильного радикала.

Рассмотрим некоторые примеры применения хемилюминесценции в присутствии люминола.

1. Определение геминовых соединений. Смесь люминола с пероксидом водорода добавляют к образцу, содержащему геминовые соединения. При этом для высвобождения гема из гемопро-теидов производят предварительную инкубацию биологического материала в щелочной среде, а для удаления примесей негемового железа добавляют избыток ЭДТА. В присутствии гема происходит разложение пероксида водорода с образованием свободных радикалов гидроксила и супероксида; интенсивность хемилюми-несценции пропорциональна количеству геминовых веществ в образце. Удаётся определить доли нг гемоглобина или миоглоби-на в 1 мл раствора. Метод используется, в частности, для определения миоглобина в моче: увеличение содержания миогло-бина наблюдается при инфарктах (И. И. Барон и сотр., 1985).

2. Определение низких концентраций металлов переменной валентности, например ионов железа. Метод аналогичен предыду-щему, но данная составляющая общей хемилюминесценции образца угнетается ЭДТА и СОД.

3. Изучение скорости разложения  $H_2O_2$  биологическим мате-риалом. При добавлении к биологическим объектам — плазме крови, гомогенатам тканей, раневым экссудатам — небольших количеств  $H_2O_2$  и люминола наблюдается хемилюминесценция, обусловленная свободнорадикальным разложением пероксида во-дорода (т. е. сопровождающаяся образованием радикалов  $\cdot OH$  и  $\cdot O_2^-$ ), затухающее во времени по мере расходования пероксида. При повторном введении пероксида вспышка хемилюминесценции повторяется. Скорость затухания характеризует суммарную спо-собность объекта разлагать  $H_2O_2$  и определяется активностью каталазы, пероксидаз и содержанием ионов металлов переменной валентности в образце. Этим методом было, например, показано, что после облучения раневой поверхности светом гелий-неонового лазера происходит усиление нерадикального (каталазного) разло-жения  $H_2O_2$  и относительное снижение образования при этом свободных радикалов. Поскольку  $H_2O_2$  всегда образуется в очагах воспаления за счет супероксидного радикала, продуцируемого фагоцитами, снижение образования свободных радикалов из  $H_2O_2$  после лазерного облучения может лежать в основе известного терапевтического действия лазерного облучения на заживающие раны.

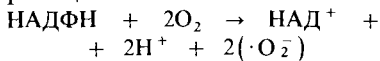
4. Изучение активности фагоцитов. Этот вопрос заслуживает специального рассмотрения.

### **9.5. Хемилюминесценция при активации фагоцитов**

Способностью к фагоцитозу обладают тканевые макрофаги и часть лейкоцитов крови (гранулоциты и моноциты). Напомним содержание лейкоцитов в 1 мкл крови здорового человека (приводится среднее число клеток, в скобках — границы нормы):

Гранулоциты:	
нейтрофильные	4150 (712—7588)
эозинофильные	165 (0—397)
базофильные	44 (0—112)
Моноциты	456 (66—846)
Лимфоциты	2185 (1029—2341)

Гранулоциты (основную часть которых составляют нейтрофилы) и моноциты, равно как и макрофаги тканей, наряду с фагоцитозом способны к выделению значительных количеств супероксидных радикалов в ответ на действие активирующих стимулов (рис. 9.5, *a, б*). В качестве последних могут выступать растительные лектины, фитогемагглютинин (ФГА), конконавалин А (Кон-А), компоненты оболочек бактерий, частички промышленных пылей (асбеста, кварца и т. д.), некоторые химические соединения (в частности, полипептиды) и комплексы антиген + антитело. Внешний стимул, приведенный в контакт с фагоцитирующей клеткой, радикально изменяет уровень ее метаболизма, в частности происходит резкое увеличение расхода глюкозы и потребления кислорода (дыхательный взрыв). При этом основная часть потребляемого кислорода восстанавливается до супероксидного радикала в результате реакции



Собственная хемилюминесценция, сопровождающая процесс образования и ферментативных превращений супероксидных радикалов, имеет низкую интенсивность, и в суспензии тканевых макрофагов ее обычно не

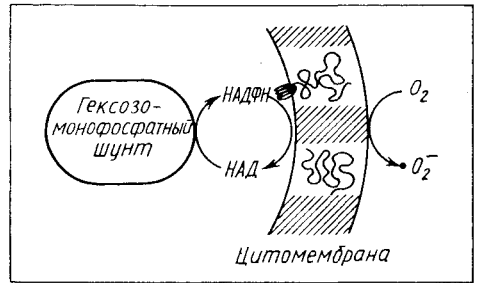
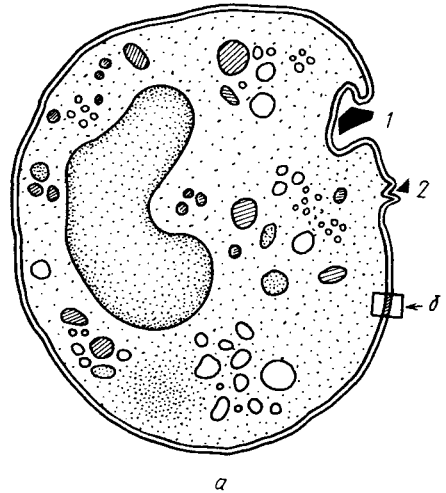
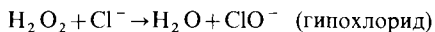


Рис. 9.5. Активации фагоцита внешним стимулом:

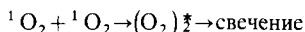
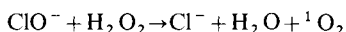
*a* — схематическое изображение клетки фагоцита; 1 — захват клеткой чужеродной частицы (фагоцитоз); 2 — активация клетки химическим веществом, например хемоаттрактантом; *б* — участок клеточной мембраны; НАДФН, образующийся при пентозофосфатном пути окисления глюкозы (гексозо-монофосфатный шунт), окисляется ферментным комплексом цитоплазматической мембраны с образованием супероксидных радикалов, в присутствии акцентора люминола наблюдается интенсивная хемилюминесценция

удаётся зарегистрировать без добавления люминола. В присутствии люминола хемилюминесценция макрофагов усиливается, если часть супероксидных радикалов переходит в гидроксильные. Это «люминолзависимое» свечение угнетается СОД (см. выше).

В гранулоцитах крови (полиморфоядерные лейкоциты, или ПМЯЛ), основную часть которых составляют нейтрофилы, содержится *миелопероксидаза*, катализирующая реакцию



Гипохлорид при взаимодействии с пероксидом водорода дает хемилюминесценцию в красной области спектра ( $\lambda_{\text{max}} = 635 \text{ нм}$ ). Предполагается следующая схема реакций:



Собственная хемилюминесценция лейкоцитов крови может быть измерена при использовании достаточно чувствительного прибора (рис. 9.6). В присутствии люминола свечение резко активируется. В модельных системах добавление гипохлорида к люминолу вызывает яркую хемилюминесценцию. Механизм реакций, которые при этом происходят, пока не вполне ясен. Это свечение не ингибируется СОД. Таким образом, свечение нейтрофилов в присутствии люминола связано отчасти с выделением радикалов ( $\cdot\text{OH}$  и  $\cdot\text{O}_2^-$ ) (эта составляющая угнетается СОД), а отчасти — с активностью миелопероксидазы и образованием гипохлорида. Эта часть свечения от СОД не зависит. У тканевых макрофагов все свечение наблюдается практически только в присутствии люминола и является СОД-зависимым (т.е. угнетается СОД).

Рассмотрим некоторые примеры хемилюминесценции при изучении активности фагоцитирующих клеток.

1. Вспышка хемилюминесценции в ответ на действующий стимул (ХЛ-ответ) обусловлена связыванием действующего вещества с рецептором на поверхности клеток либо с прямым нарушением барьерной функции липидного слоя мембран. Так, активация нейтрофилов, сопровождающаяся хемилюми-

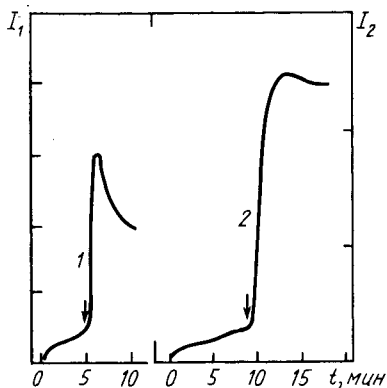


Рис. 9.6. Вспышка хемилюминесценции на добавление активатора (опсонизированного зимозана) к суспензии полиморфноядерных лейкоцитов:

1 — без активатора хемилюминесценции,  $10^6$  клеток в мл; 2 — с люминолом в качестве активатора свечения,  $10^4$  клеток в мл; чувствительность установки для 1 была в 20 раз выше, чем для 2 (С. Рибаров и сотр., 1986)



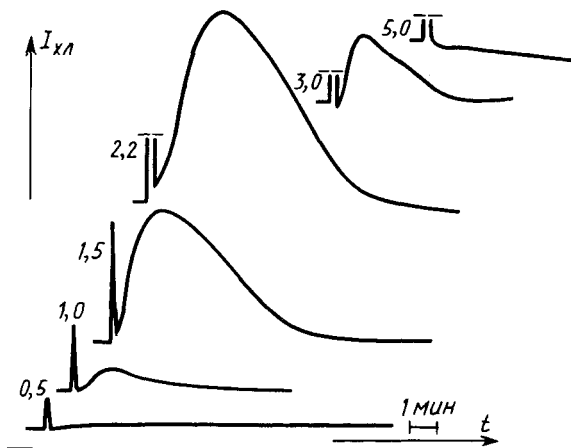


Рис. 9.7. Активация перитонеальных макрофагов импульсами электрического поля:

$I_{хл}$  — интенсивность хемилюминесценции в относительных единицах;  $t$  — время опыта; короткие вспышки вызваны образованием свободных радикалов на электродах в момент подачи электрического импульса; медленные обусловлены выделением свободных радикалов активированными клетками; цифры у кривых — напряженность импульсов электрического поля кВ/см

несценцией, вызывается добавлением к клеткам кальциевого ионофора, антибиотика полимиксина в сочетании со свободными жирными кислотами (Е. А. Корепанова и сотр., 1986) или действием импульсов электрического поля достаточной напряженности, которые вызывают электрический пробой липидного слоя мембран (Е. А. Анабердыева и сотр., 1986) (рис. 9.7). Все эти агенты вызывают входение в клеточный сок ионов  $Ca^{2+}$ , которые запускают каскад внутриклеточных процессов, заканчивающийся выделением супероксидных радикалов цитомембраной. Таким образом, следя за ХЛ-ответами клеток, можно изучать влияние различных агентов на клеточную проницаемость; в этом смысле нейтрофилы или макрофаги могут служить хорошим экспериментальным объектом.

2. Б. Т. Величковский, Л. Г. Коркина и сотр. предложили метод оценки токсичности промышленных пылей, основанный на изучении ХЛ-ответов перитонеальных макрофагов. Взаимодействие с нетоксическими пылями вызывало слабый и длительный ХЛ-ответ перитонеальных макрофагов. Взаимодействие с нетоксическими пылями вызывало слабый и длительный ХЛ-ответ (рис. 9.8, кривая 1). Пыли умеренно токсичные вызывали мощный ответ, т. е. резкий выброс супероксидных радикалов (рис. 9.8, кривая 2). В этих двух случаях клетки сохраняли жизнеспособность, поскольку в ответ на введение дополнительных количеств какого-либо стимулятора, например порошка кварца, они вновь

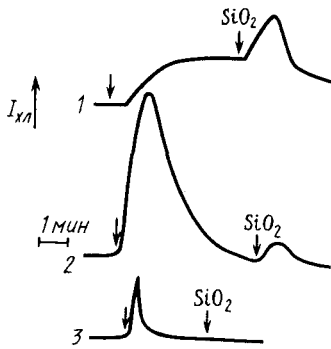


Рис. 9.8. Хемилюминесцентные ответы перитонеальных макрофагов на введение промышленных пылей разной токсичности: 1 — малотоксичная пыль; 2 — среднетоксичная; 3 — высокотоксичная; дополнительное введение кварцевой пыли  $\text{SiO}_2$  показывало, сохранили ли клетки жизнеспособность

генерировали радикалы (вторая вспышка на рис. 9.8, 1 и 2). При добавлении к макрофагам высокотоксических пылей наблюдался очень кратковременный ответ, сопровождающийся исчезновением свечения. Клетки при этом погибали; повторное введение стимулятора не приводило к активации хемилюминесценции (см. рис. 9.8, кривая 3). Выявление цитотоксичности пылей чрезвычайно важно, так как именно пыль лежит в основе тяжелого профессионального заболевания работников добывающей промышленности — силикоза.

3. Используя аналогичный подход, но взяв в качестве объекта нейтрофилы из крови пациентов, можно определить индивидуальную чувствительность к пылям у персонала, работающего в

контакте с промышленными пылями. Оказывается, ХЛ-ответы клеток различны у разных людей. Можно думать, что у тех, у кого эти ответы значительны, повышена чувствительность к данной пыли.

4. Ответ лейкоцитов крови на действие какого-либо стандартного стимула, например на введение частиц латекса, в ряде случаев может служить диагностическим признаком. При наследственном заболевании — хроническом грануломатозе — нейтрофилы вообще не обладают способностью продуцировать супероксидные радикалы. Такие клетки захватывают микроорганизмы, но последние при этом не погибают и продолжают размножаться. ХЛ-ответ лейкоцитов такого больного вообще отсутствует.

5. Противоположная ситуация — резкая активация хемилюминесцентного ответа — сопровождается появлением в организме человека каких-либо очагов некроза. Так, у больных, перенесших даже очень небольшой инфаркт, ХЛ-ответ лейкоцитов возрастает в 10—20 раз по сравнению с нормой, чего не наблюдается у других больных ишемической болезнью сердца, но не перенесших инфаркт (см. табл. 9.1).

Таблица 9.1. Относительная интенсивность хемилюминесценции лейкоцитарной массы доноров и больных ишемической болезнью сердца

Группы больных	Интенсивность хемилюминесценции
Доноры	$12,7 \pm 1,11$
Хроническая ишемическая болезнь сердца	$43,5 \pm 7,92$
Инфаркт миокарда	$326,1 \pm 47,3$

6. Острые воспаления сопровождаются активацией ХЛ-ответов лейкоцитов. При пересадке органов резкая активация ХЛ-ответов наблюдается непосредственно перед отторжением. При хро-

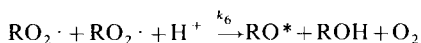
нических воспалениях ХЛ-ответы нейтрофилов и моноцитов снижаются.

7. Весьма перспективно использование перитонеальных макрофагов лабораторных животных для обнаружения иммунных комплексов в изучаемом объекте. Как известно, при образовании комплекса антиген-антитело обнажается  $F_c$ -фрагмент на поверхности иммуноглобулинов. Макрофаги, как и нейтрофилы, имеют рецепторы к этому фрагменту, поэтому они реагируют на появление иммунных комплексов в окружающей среде выделением кислородных радикалов, что проявляется в виде ХЛ-ответа в присутствии люминола. Если кровь больного уже содержит иммунные комплексы, то добавление сыворотки такого больного к суспензии макрофагов в присутствии люминола сопровождается вспышкой хемилюминесценции. Если в крови содержатся антитела к какому-либо чужеродному материалу (например, к аллергенам), то вспышка хемилюминесценции наблюдается только при одновременном добавлении к макрофагам и антигена (аллергена в нашем случае). Таким образом, можно выяснить наличие аллергии к какому-либо лекарству у больного. В других случаях, напротив, используя выделенные антитела к какому-либо веществу, можно обнаружить само это вещество, так как оно даст с антителом иммунный комплекс, который активирует макрофаги.

Таким образом, способность фагоцитов давать ХЛ-ответы на добавление материала, содержащего иммунные комплексы, дает богатые возможности для иммунологических исследований с использованием хемилюминесцентного метода.

## 9.6. Хемилюминесценция при пероксидном окислении липидов

Процесс прямого окисления липидов молекулярным кислородом идет в клетках и плазме крови по механизму цепной реакции. Разработка высокочувствительного прибора для измерения сверхслабых свечений, основанного на фотоумножителе, охлаждаемого жидким азотом и работающего в режиме счетчика фотонов (Ю. А. Владимиров, Ф. Ф. Литвин, 1959), позволила обнаружить хемилюминесценцию, сопровождающую пероксидное окисление липидов в изолированном состоянии и непосредственно в живой ткани (Б. Н. Тарусов и сопр., 1961). Реакцией, сопровождающейся свечением, согласно современным данным, является реакция диспропорционирования пероксидных радикалов липидов:



Здесь  $k_6$  — константа скорости реакции.

Свечение лежит в сине-зеленой области спектра ( $\lambda_{\max} = 540$  нм) (рис. 9.9), но по мере накопления продуктов окисления максимум

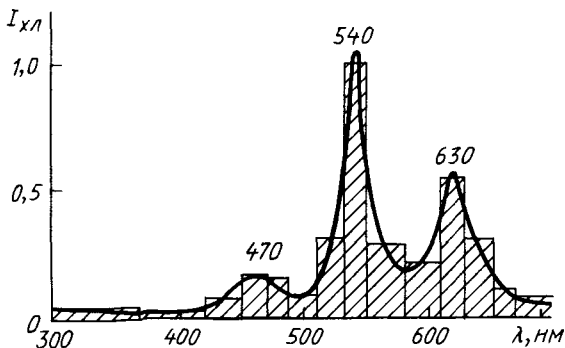


Рис. 9.9. Спектры хемилюминесценции суспензии липосом из суммарной фракции яичных фосфолипидов в присутствии  $\text{Fe}^{2+}$  (медленная вспышка): спектры измерялись с помощью лабра граничных абсорбционных светофильтров, с поправкой на спектральную чувствительность ФЭУ-100 (170–830 нм) (В. С. Шаров, Ю. А. Владимиров, 1983)

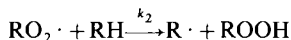
случается в красную область (610—630 нм), а интенсивность свечения возрастает; это говорит о том, что продукты окисления могут служить активаторами свечения.

Регистрация хемилюминесценции при пероксидном окислении позволяет измерять кинетику изменения стационарной концентрации свободных радикалов в системе во времени, а вместе с тем — измерять скорость реакции пероксидного окисления в каждый данный момент времени. Найдем связь между концентрацией радикалов  $\text{RO}_2 \cdot$  и интенсивностью свечения  $I_{\text{хл}}$ . Она следует из уравнения реакции (см. выше)

$$I_{\text{хл}} = \eta_{\text{хл}} k_6 [\text{RO}_2 \cdot]^2 \quad (9.1)$$

Здесь  $I_{\text{хл}}$  — общий световой поток хемилюминесценции во всех направлениях и при всех длинах волн, эйнштейн/с;  $\eta_{\text{хл}}$  — квантовый выход хемилюминесценции.

Скорость процесса пероксидного окисления  $v$  — это скорость образования продуктов окисления гидропероксидов в реакции



где  $k_2$  — константа скорости,

$$v = k_2 [\text{RH}] \sqrt{I_{\text{хл}} / (\eta_{\text{хл}} k_6)}. \quad (9.2)$$

Итак, скорость пероксидного окисления пропорциональна стационарной концентрации свободных радикалов в системе и связана с интенсивностью хемилюминесценции уравнением, которое легко выводится с учетом уравнения (9.1).

Регистрируя интенсивность хемилюминесценции, можно следить за изменениями во времени скорости пероксидного окисления липидов, т. е. изучать кинетику этого процесса. В качестве примера на рис. 9.10 приведены кривые хемилюминесценции суспензии митохондрий, к которой добавили ионы двухвалентного железа.

Рассмотрим некоторые примеры использования хемилюминесценции, сопровождающей реакции липидных свободных радикалов.

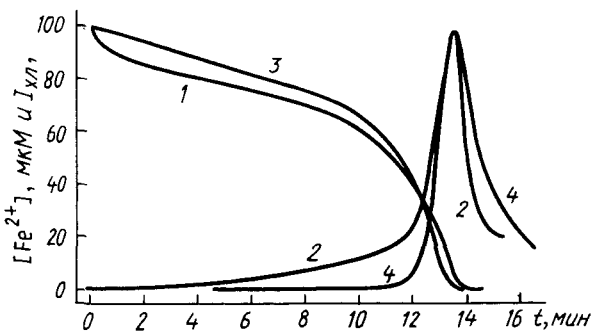


Рис. 9.10. Кривые кинетики хемилюминесценции суспензии митохондрий, к которой добавили ионы двухвалентного железа:

1 и 2 — экспериментальные кривые; 3 и 4 — кривые, рассчитанные с помощью ЭВМ после того, как на основе серии опытов была составлена система уравнений и подобраны константы скоростей реакций; 1 и 3 — изменение концентрации двухвалентного железа; 2 — интенсивность хемилюминесценции; 4 — квадрат концентрации пероксидных радикалов

1. Исследование кинетики процесса пероксидного окисления липидов в различных условиях позволяет выяснить химический механизм отдельных стадий процесса (парциальных реакций) и определить константы скоростей этих реакций. Так, схема реакций, приведенная в разд. 5.4, была уточнена именно благодаря исследованиям кинетики, причем основным методом было измерение хемилюминесценции (Ю. А. Владимиров и сотр., 1972, 1980).

2. Измерение кинетики хемилюминесценции позволяет исследовать механизм действия различных соединений на пероксидное окисление липидов. Дело в том, что хотя конечный результат действия различных веществ сводится к ускорению процесса пероксидного окисления (прооксиданты) или к его замедлению (антиоксиданты), механизм действия разных веществ может быть совершенно различным, и это легко обнаруживается при сопоставлении кинетики процессов, измеряемой с использованием метода хемилюминесценции. В качестве примера на рис. 9.11 приведено сопоставление кинетики пероксидного окисления суспензии липосом, к которым добавляли ионы двухвалентного железа и различные антиоксиданты: ионол (дитретбутилокситолуол), лекарственный препарат пипольфен и дипептид карнозин ( $\beta$ -аланил-гистидин). Все три вещества — антиоксиданты, но ионол и пипольфен действуют как ловушки свободных радикалов липидов, обрывая цепи окисления, тогда как карнозин — комплексон, снижающий количество ионов железа, которые резко активируют процесс пероксидного окисления путем разветвления цепей.

3. Измерение кинетики хемилюминесценции позволяет определить антиокислительную активность того или иного химического соединения (эта величина обратна концентрации, вызывающей

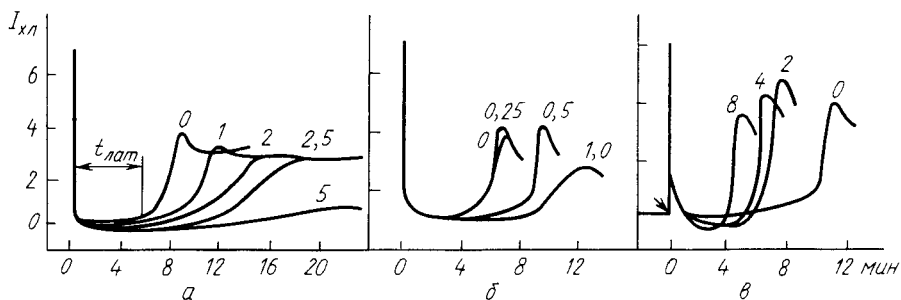


Рис. 9.11. Влияние различных антиокислителей на кинетику хемилюминесценции в суспензии однослойных липосом, к которым добавили соли железа, а также антиокислитель:

*a* — инол; *б* — пинопольфен; *в* — карнозин; для *a* и *б* концентрации у кривых даны в мкмоль/л; для *в* — в ммоль/л;  $t_{\text{лат}}$  — латентный период (период индукции) (Ю. А. Владимиров и сотр., 1986)

определенную степень замедления процесса) или содержание антиокислителей в том или ином образце. Такие измерения осуществляют как с использованием растворов липидов (например, раствора метилолеата, Е. Б. Бурлакова, 1975), так и с использованием суспензий мембранных структур (Ю. А. Владимиров, А. И. Арчаков, 1972). Мерой антиокислительной активности обычно принимают задержку в развитии пероксидного окисления (и хемилюминесценции), называемую *периодом индукции* или *латентным периодом* (рис. 9.11).

4. Хемилюминесценция наблюдается не только при пероксидном окислении липидов мембраны, но и при таком же процессе в липопротеидах. На этом основан ряд методов диагностики болезней. Существует несколько вариантов метода.

В 1967 г. Л. А. Куликовой и независимо А. И. Митрофановым и А. И. Журавлевым было предложено использовать в качестве диагностического теста спонтанную хемилюминесценцию сыворотки и плазмы животных и человека. В качестве примера приведем результаты, полученные при исследовании спонтанной хемилюминесценции сыворотки крови здоровых людей и больных туберкулезом легких и раком легких (А. И. Шполянская, 1972). Оказалось, что спонтанная хемилюминесценция больных раком легких ( $11 \pm 2$  имп/10 с) значительно ниже, а больных туберкулезом легких ( $27 \pm 8$  имп/10 с) значительно выше, чем у здоровых людей ( $18 \pm 3$  имп/10 с).

В дальнейшем этот метод был модифицирован: сыворотку после помещения в кювету дополнительно освещали УФ-лучами. Было установлено, что у больных злокачественными образованиями УФ-индуцированная хемилюминесценция (фотохемилюминесценция) не определяется. У здоровых людей она существует. Для активации пероксидного окисления липидов в плазме крови (и, следовательно, хемилюминесценции) было предложено использо-

вать пероксид водорода. В частности, было показано, что если принять интенсивность свечения здоровых доноров за 100% ( $\pm 7\%$ ), то при тромбозах II степени она составляла  $174 \pm 14\%$ , а при тромбозах I степени —  $283 \pm 23\%$ . Снижение хемилюминесценции в присутствии  $H_2O_2$  наблюдалось также у раковых больных.

Рядом авторов (Ю. М. Лопухин, А. П. Шаров и сотр., 1974; Р. Р. Фархутдинов и Ю. А. Владимир, 1974) использовалась хемилюминесценция сыворотки, плазмы крови и изолированных липопротеидов в присутствии солей двухвалентного железа (рис. 9.12). Светосумма свечения увеличивалась при воспалительных заболеваниях, атеросклерозе и снижалась при ишемических состояниях. На этой основе было также предложено несколько диагностических тестов.

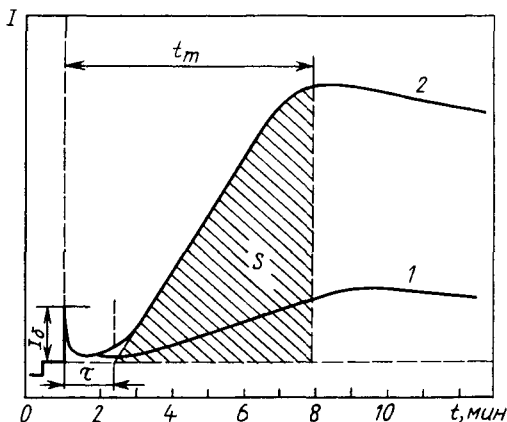
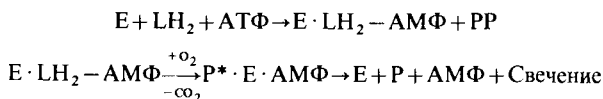


Рис. 9.12. Хемилюминесценция сыворотки крови (1) и липопротеидов, выделенных из этой сыворотки методом осаждения гепарином (2) при добавлении солей двухвалентного железа: светосумма кривой 1 возрастает при воспалении внутренних органов; при гипоксических состояниях разница между кривыми 1 и 2 увеличивается из-за появления тушителей хемилюминесценции в крови;  $t_m$  — период развития свечения; S — светосумма

### 9.7. Биоломинесценция и ее аналитическое применение

В настоящее время измерение свечения, сопровождающего ферментативные реакции (биоломинесценции), находит довольно широкое применение в аналитической биохимии. Биоломинесценция в системе, содержащей люциферин и люциферазу, выделенные из светляков, — самый чувствительный метод определения АТФ в биологическом материале. Схема реакций при биоломинесценции выглядит следующим образом (Мак Элрой и Де Люка, 1973):



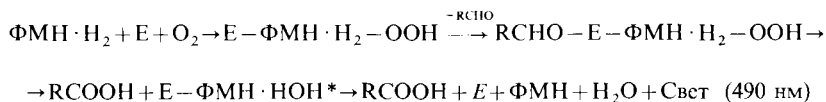
Здесь АМФ — аденозинмонофосфат; PP — пирофосфат; E — люцифераза;  $LH_2$  — люциферин;  $P^*$  и P — продукт реакции (оксилуциферин) в возбужденном и основном состояниях. Более подробно заключительные стадии биоломинесцентной реакции даны на с. 162.

В отсутствие АТФ биолюминесценция не происходит, свечение пропорционально концентрации АТФ (ниже 1 мМ); минимально определяемые количества АТФ  $10^{-17}$  моль в образце. Поскольку биосинтез АТФ — показатель нормальной жизнедеятельности клеток, препарат люциферин — люцифераза светляка используют для обнаружения бактериального заражения в какой-либо среде, оценки жизнеспособности эритроцитов при консервировании крови, изучения действия на микроорганизмы антибиотиков и т.д. Главным ограничением метода биолюминесценции является трудность получения биологического материала — светляков и нестойкость выделенного фермента. В последнее время используют препараты иммобилизованной люциферазы, стабильность которой выше; препарат можно использовать многократно (Н. Н. Угарова, Л. Б. Бровка, 1983).

В научных исследованиях получил распространение метод определения малых количеств ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в биологическом материале по биолюминесценции, катализируемой белковым комплексом (фотопротеином) экворинном, выделенным из медузы *Aequorea*. В фотопротеине люциферин ковалентно связан с белком, и его внутримолекулярное превращение в излучающий продукт инициируется добавками ионов  $\text{Ca}^{2+}$ .

Вследствие малой инерционности и высокой чувствительности биолюминесцентный метод особенно эффективен при изучении высвобождения и связывания  $\text{Ca}^{2+}$  в биологических системах, например, во время мышечного сокращения. При этом экворин добавляют прямо к изучаемому объекту и по интенсивности биолюминесценции следят за динамикой изменения содержания свободного кальция в системе.

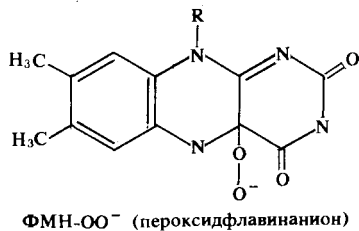
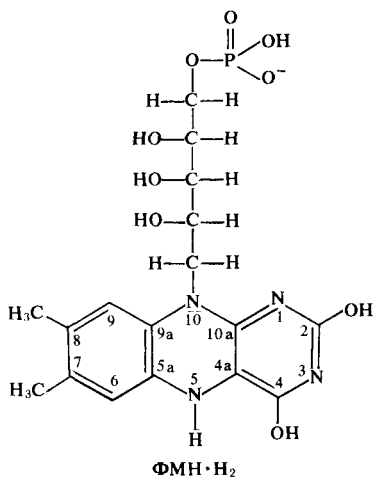
Рассмотрим теперь возможности применения бактериальной люминесценции в практике биохимических и клинических исследований. К числу светящихся относится немного видов бактерий. Хемилюминесцентная реакция, непосредственно сопровождаемая свечением, катализируется ферментом — бактериальной люциферазой и включает в себя процессы окисления восстановленного флавиномононуклеотида  $\text{FMN} \cdot \text{H}_2$  до  $\text{FMN}$  и одновременно — алифатического ( $\text{C}_{14}$ ) альдегида до миристиновой ( $\text{C}_{14}$ ) кислоты. Эта реакция протекает, по-видимому, через стадию образования пероксида флавиномононуклеотида:



Здесь E — люцифераза; OON — гидропероксидная группа; RCHO — альдегид; RCOOH — миристиновая кислота.

Приводим структуру  $\text{FMNH}_2$  и  $\text{FMN} - \text{OON}$ :





Поскольку светящиеся бактерии сравнительно легко культивируются, в последние годы получают все большее распространение биохимические анализы, в которых в качестве тест-объекта используют целые бактериальные клетки (в суспензии), экстракты светящихся бактерий, изолированный фермент люциферазу. В табл. 9.2 приведены некоторые примеры использования бактериальной биолюминесценции в биохимических анализах. Самым первым было использование фотобактерий для обнаружения кислорода, выделяемого при фотосинтезе. В настоящее время биолюминесценцию бактерий также используют в качестве высокочувствительного метода определения низких концентраций кислорода. В отсутствие кислорода фотобактерии не обладают свечением, свечение усиливается пропорционально концентрации кислорода в среде в интервале концентраций  $O_2$  от  $2 \cdot 10^{-8}$  до  $5 \cdot 10^{-6}$  моль/л. Биолюминесцентный метод позволяет исследовать сродство к кислороду миоглобинов, гемоглобинов, дрожжей и низших животных, цитохромоксидазы, т.е. соединений с высоким сродством к кислороду. Равновесные концентрации этих веществ можно изучать только при низком содержании кислорода в среде.

Суспензия светящихся бактерий — удобный объект для определения концентрации антибиотиков и различных токсических соединений, которые угнетают жизнедеятельность бактерий и снижают тем самым интенсивность биолюминесценции.

Но наиболее перспективно, несомненно, применение очищенных препаратов бактериальной люциферазы. Фермент, очищенный от примесей низкомолекулярных соединений, обладает способностью к излучению света лишь в присутствии всех трех субстратов: кислорода, ФМН·Н<sub>2</sub> и длинноцепочечного альдегида (с длиной цепи не менее 8 углеродных атомов). Добавив к

Таблица 9.2. Примеры использования бактериальной люминесценции в аналитической биохимии

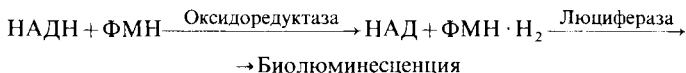
Применяемый препарат	Анализируемое соединение	Чувствительность метода
ФБ*: Photobacterium ФБ: Ph. leiognathi	Кислород Антибиотики: хлортетрациклин граммицидин С	0,01—1 нмоль/л 30—60 Ед/мл 20—30 Ед/мл
МШ: Beneckia harvegi	Миристат (липазы) Миристат (полисахариды)	10 пмоль/мин 10 пмоль/мин
МШ: Beneckia harvegi	Мутагены (обратные мутации)	нг
ФБ	Различные токсические вещества	нг
Л+ФМН·Н <sub>2</sub>	Альдегиды Феромоны	0,5 пмоль 0,01 пмоль
Л+А	ФМН и ФАД (после гидролиза и восстановления до ФМН·Н <sub>2</sub> )	0,01 фмоль
Л+ОР+А+ФМН	НАДН	0,01—1 пмоль
Л+ОР+А+НАД·Н	ФМН (без процедуры восстановления до ФМН·Н <sub>2</sub> )	10 <sup>-14</sup> —10 <sup>-7</sup> моль
Л+ОР+А+ФМН+ +НАД <sup>+</sup> +ДГ	Субстрат дегидрогеназы	пмоли
Л+ОР+А+ФМН+ +НАД <sup>+</sup> +субстрат ДГ	Активность дегидрогеназ	»
Л+ОР+А+ФМН+ НАД <sup>+</sup> +Г+ГК+ГДГ	АТФ	»

\* Сокращения: А—алифатический альдегид (обычно C<sub>15</sub>); Г—глюкоза; ГК—гексокиназа; ГДГ—глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа; ДГ—дегидрогеназы; Л—бактериальная люцифераза, МШ—мутантный штамм светящейся бактерии, ФБ—суспензия светящихся бактерий, ОР—никотинамид-флавиномононуклеотид оксидоредуктаза

изолированной бактериальной люциферазе ФМН·Н<sub>2</sub>, исследователь получает высокочувствительную систему для определения алифатических альдегидов; к их числу принадлежат, в частности, половые гормоны насекомых, феромоны, которые обнаруживаются в количестве 10<sup>-14</sup> моль, что позволяет изучать метаболизм этих веществ у одной особи. В медицине обещает найти широкое применение анализ содержания ФМН и ФАД, основанный на биолюминесцентном определении ФМН·Н<sub>2</sub>, образующегося из окисленных форм флавиннуклеотидов при их предварительном восстановлении.

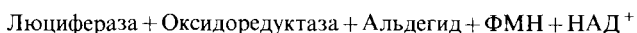
Наиболее широкое применение в биохимических и клинических лабораторных анализах обещает получить препарат, состоящий из смеси двух компонентов (ферментов): бактериальной люциферазы и НАДН:ФМН-оксидоредуктазы.

В отечественном наборе КРАБ (комплект реактивов для анализа биолюминесценции) содержатся люцифераза и оксидоредуктаза, выделенные из биомассы светящихся бактерий. Добавив к препарату в присутствии С<sub>15</sub>-альдегида НАДН, получается высокочувствительный реактив для определения ФМН (без его предварительного восстановления):



Наоборот, если добавить к смеси люциферазы и оксидоредуктазы альдегид и ФМН, то такая смесь может использоваться как биолюминесцентная тест-система для количественного определения НАДН в биологических материалах; схема реакций такая же.

Удлиняя цепочку биохимических стадий, предшествующих биолюминесценции, можно получить все новые аналитические возможности. Для определения активности ферментов дегидрогеназ или (альтернативно) для определения концентрации субстратов этих ферментов используется следующая тест-система:



В присутствии субстрата какой-либо дегидрогеназы, например в присутствии лактата, можно определять по биолюминесценции активность соответствующей дегидрогеназы (в нашем примере активность ЛДГ, лактатдегидрогеназы):



и далее по схеме, приведенной выше.

В присутствии изолированной дегидрогеназы можно определять концентрацию субстрата этого фермента в интересующей нас химической или биохимической системе (схема реакций та же).

Примером еще более сложной смеси может служить набор для определения АТФ. Он включает в себя 4 фермента и субстраты:

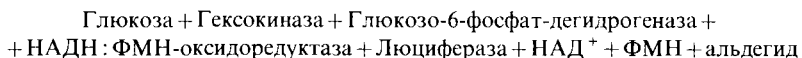
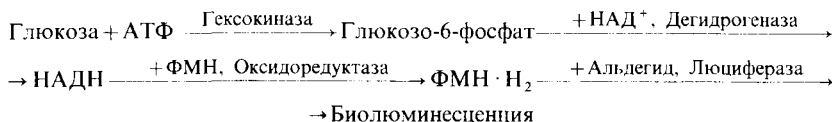


Схема реакций при определении АТФ с использованием бактериальной люминесценции имеет внушительный вид:



Несмотря на то что для аналитического определения АТФ таким способом нужно четыре ферментных препарата, существует

мнение, что этот метод вытеснит со временем применение люциферазы светляков, так как ловить насекомых во время лета труднее, чем выращивать бактерии. Впрочем, развитие генной инженерии может привести к биотехнической выработке светляковой люциферазы в достаточных количествах.

## ЛИТЕРАТУРА

### *Использованная литература*

- Барлтроп Дж., Коил Дж.** Возбужденные состояния в органической химии.—М.: Мир, 1978.
- Борг Д.** Применение электронного парамагнитного резонанса в биологии // Сб.: Свободные радикалы в биологии.—М.: Мир, 1979. Т. 1. С. 88.
- Бурштейн Э. А.** Люминесценция белковых хромофоров (модельные исследования) // Сб.: Биофизика.—М.: (Итоги науки и техники. ВИНТИ АН СССР), 1976. Т. 6.
- Владимиров Ю. А., Арчаков А. И.** Перекисное окисление липидов в биологических мембранах.—М.: Наука, 1972.
- Владимиров Ю. А., Добрецов Г. Е.** Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран.—М.: Наука, 1980.
- Владимиров Ю. А., Оленев В. И., Сулова Т. Б., Потапенко А. Я.** Механизм перекисного окисления липидов и его действие на биологические мембраны // Сб.: Биофизика.—М.: (Итоги науки и техники. ВИНТИ АН СССР), 1975. Т. 5. С. 56.
- Владимиров Ю. А., Рошупкин Д. И., Потапенко А. Я., Деев А. И.** Биофизика.—М.: Медицина, 1983.
- Волькенштейн М. В.** Физика и биология.—М.: Наука, 1980.
- Ермолаев В. Л.** Сенсибилизированная фосфоресценция органических соединений: триплет-триплетный перенос энергии // Сб.: Элементарные фотопроцессы в молекулах. М.—Л.: Наука, 1966. С. 147.
- Ермолаев В. Л., Антипенко Б. М., Свешникова Е. Б., Тачин В. С., Шахвердов Т. А.** Механизм безызлучательного переноса энергии при обменно-резонансных взаимодействиях в конденсированной фазе // Сб.: Молекулярная фотоника.—Л.: Наука, 1970. С. 44.
- Калверт Дж., Питтс Дж.** Фотохимия.—М.: Мир, 1968.
- Каитор Ч., Шиммель П.** Биофизическая химия.—М.: Мир, 1984, 1985, Т. 1—3.
- Коиев С. В., Вологовский И. Д.** Фотобиология.—Минск: Изд-во БГУ, 1979.
- Красновский А. А. (мл.)** Люминесценция при фотосенсибилизированном образовании синглетного кислорода в растворах // Сб.: Возбужденные молекулы. Кинетика превращений.—Л.: Наука, 1982. С. 32.
- Лакович Дж.** Основы флуоресцентной спектроскопии.—М.: Мир, 1986.
- Мак-Глинн С., Адзуми Т., Киносита М.** Молекулярная спектроскопия триплетного состояния.—М.: Мир, 1972.
- Мерзляк М. Н., Соболев А. С.** Роль супероксидных анион-радикалов и синглетного кислорода в патологии мембран // Сб.: Биофизика.—М.: (Итоги науки и техники ВИНТИ АН СССР), 1975. Т. 5. С. 118.
- Паркер С.** Фотолюминесценция растворов.—М.: Мир, 1972.
- Рвачев В. П.** Введение в биофизическую фотометрию (фотометрические измерения в биологии).—Львов: Изд-во Львовского университета, 1966.
- Рид С.** Возбужденные электронные состояния в химии и биологии.—М.: ИЛ, 1960.
- Рошупкин Д. И., Потапенко А. Я., Клебанов Г. И.** Практикум по биофизике. Лабораторные работы по спектральным методам исследования и фотобиологии.—М.: МЗ РСФСР, 1975. Ч. 1.

**Рабек Я.** Экспериментальные методы в фотохимии и фотофизике.—М.: Мир, 1985. Т. 1,2.

**Рэби Б., Рабек Я.** Фотодеструкция, фотоокисление, фотостабилизация полимеров.—М.: Мир, 1978.

**Сетлоу Р., Поллард Э.** Молекулярная биофизика.—М.: Мир, 1964.

**Тумерман Л. А.** Люминесценция // Сб.: Физические методы исследования белков и нуклеиновых кислот.—М.: Наука, 1967. С. 166.

**Турро Н.** Молекулярная фотохимия.—М.: Мир, 1967.

**Шляпникох В. Я.** Фотохимическое превращения и стабилизация полимеров.—М.: Химия, 1979.

Экспериментальные методы химической кинетики/Под ред. Н. М. Эмануэля и Г. Б. Сергеева.—М.: Высшая школа, 1980.

**Юденфрейд С.** Флуоресцентный анализ в биологии и медицине.—М.: Мир, 1965.

#### *Рекомендуемая литература*

**Аккерман Ю.** Биофизика.—М.: Мир, 1964.

**Алфимова Е. Я., Лихтенштейн Г. И.** Флуоресцентное исследование переноса энергии как метод изучения структуры белков // Сб.: Молекулярная биология.—М.: (Итоги науки и техники ВИНТИ АН СССР), 1976. Т. 8. Ч. II. С. 127.

**Бых А. И., Васильев Р. Ф., Рожцкий Н. Н.** Электрохемилюминесценция раст-  
воров органических соединений // Сб.: Радиационная химия. Фотохимия.—М.:  
(Итоги науки и техники ВИНТИ АН СССР), 1979. Т. 2.

**Волькенштейн М. В.** Молекулярная биофизика.—М.: Наука, 1975.

**Волькенштейн М. В.** Общая биофизика.—М.: Наука, 1978.

**Волькенштейн М. В.** Биофизика.—М.: Наука, 1981.

**Добрецов Г. Е.** Флуоресцентные зонды: оптические свойства и взаимодействие с мембранами // Сб.: Биофизика.—М.: (Итоги науки и техники ВИНТИ АН СССР), 1979. Т. 2. С. 101.

**Доис Э.** Количественные проблемы биохимии.—М.: Мир, 1983.

**Зайдель А. Н., Островская Г. В., Островский Ю. И.** Техника и практика спект-  
роскопии.—М.: Наука, 1976.

**Зеленин А. В.** Люминесцентная цитохимия нуклеиновых кислот.—М.: Наука, 1967.

**Ладик Я.** Квантовая биохимия для химиков и биологов.—М.: Мир, 1975.

**Маршелл Э.** Биофизическая химия.—М.: Мир, 1981.

**Пюльман Б., Пюльман А.** Квантовая биохимия.—М.: Мир, 1965.

Практикум по физико-химическим методам в биологии/Под ред. Ф. Ф. Лит-  
вина.—М.: Изд-во МГУ, 1981.

**Свердлова О. В.** Электронные спектры в органической химии.—Л.: Химия, 1973.

**Сент-Дьердьи А.** Биоэлектроника.—М.: Мир, 1971.

**Фрайфелдер Д.** Физическая биохимия.—М.: Мир, 1980.

## ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

- Аденин 97, 100, 101  
Азид натрия 124  
Акридиновые красители 56  
Акридиновый оранжевый 56  
Акрифлавин 74  
Акрихин 100  
Активные формы кислорода 157, 170  
9-Аминоакридин 55  
Анафилактический шок 140  
Анизил 78  
Анизотропия люминесценции 58, 59, 62  
1-Анилинафтален-8-сульфонат (АНС)  
40, 41, 74, 76  
Антиокислительная активность 181  
Антиоксиданты 95, 110, 115, 124, 134,  
135, 137, 143, 156, 181, 182  
Антрацен 31, 79, 126, 127, 160  
Аполипопротеид-аля 74  
Арахидоновая кислота 109  
Аргинин 101  
Ароматические аминокислоты 66, 75,  
89, 94, 117, 159  
— фотоповреждение 102—108  
Артериолы 131  
Аспирин 135  
Астма 140  
Атеросклероз 63, 183  
АТФазы 75, 139, 152  
Ацетилхолинэстераза 74, 139  
Ацетон 18  
Ацетофенон 100, 166
- Базальные клетки 131  
Белки  
— флуоресценция 76  
— фотоповреждение 102—104, 108, 112  
Бенгальский розовый 127  
Бензальдегид 77  
Бензил 78  
Бензокумарин 161  
Бензол 80, 90  
Бензофенон 78  
3,4-Бензпирен 127, 138  
Билирубин 144  
Биолюминесценция 28, 82, 157, 161,  
183—187  
Биохемилюминесценция 82  
Бычий сывороточный альбумин 56, 101
- Венулы 131  
Витамин Е 95, 110  
Витилиго 142  
Время вращательной релаксации 61  
— — — корреляции 61
- Время жизни  
— возбужденных состояний 9, 39, 46—53,  
61  
— — — излучательное 52, 53, 170  
— — — реальное 53  
— — — синглетных 29, 41, 46, 47, 57, 71,  
72, 97, 169  
— — — триплетных 29, 64—68, 78, 169  
— синглетного кислорода 122, 123  
— флуоресценции нуклеотидов 97  
Вязкость 38, 39, 57, 69, 70, 147
- Гем 76, 174  
Гематопорфирин 129, 144  
Гемоглобин 24, 26, 138, 144, 174, 185  
Гемолиз 24, 25, 109, 112, 121, 127, 129,  
139  
Гемопротейны 55, 174  
Гипербилирубинемия 144  
Гиперхромный эффект 97  
Гипоталамус 87  
Гипохлорид 176  
Гистамин 134  
Гистидин 101, 134, 139  
Глаз 145, 146  
— фотоповреждение 155, 156  
Глицилглицин 108  
Глицилтриптофан 107  
Глицин 107  
Глюкуронилтрансфераза 144  
Глюкуроновая кислота 144  
цГМФ 152—154  
Гнездная плешивость 142  
Грамицидин С 186  
Гранулоциты 170, 174—176  
Грибовидный микоз 142  
Гризеофульвин 130  
Гуанилатциклаза 153  
Гуанин 97, 100
- Дальтонизм 154  
Дансилхлорид 62  
Деполаризация флуоресценции 61, 62,  
71  
Дерма 131, 133, 142  
Детергенты 121  
Диагностика опухолей 145  
1,4-Диазобикакло [2,2,2]октан 156  
Диацетил 78, 166  
Дибромантрацен 168  
Диеновые конъюгаты 16, 91, 112  
4-Диметиламинохалкон 38, 39, 76  
7,12-Диметилбензатрацен 138  
Диоксетан 127, 162, 164

- 5,6-Диоксииндол 136  
 3,4-Диоксифенилаланин 91, 108, 125—127, 136  
 — перенос заряда 91  
 Дипольный момент 14, 38, 39, 72, 88, 147  
 — диметиламинохалкона 38  
 1,6-Дифенил-1,3-гексатриен 63  
 Дифенилизобензофуран 124  
 Диффузия  
 — вращательная 61, 62  
 — константа скорости 78  
 — латеральная 147  
 — поступательная 62  
 Диэлектрическая проницаемость 38  
 ДНК  
 — односторонние разрывы 101  
 — перенос энергии 79, 80  
 — фотоприсоединение фурукумаринов 117—119  
 — фотохимия 79, 96—102, 138  
 Доза облучения 8, 84  
 Докозагексеновая кислота 147  
 Донорно-акцепторные свойства молекул 89, 90  
 Дофахинон 136  
 Дофахром 136  
 Дрожжи 109, 185  
 Дыхательный взрыв 175
- Европий 79
- Желтуха новорожденных 143, 144
- Загар 127, 135  
 Закон  
 — Бугера — Ламберта — Бера 10, 12, 13, 20, 26, 34, 43  
 — Вавилова 30, 32, 41  
 — Стокса 30, 36, 39, 44  
 Замедленная флуоресценция 68, 69  
 Злокачественные опухоли 63, 137, 138, 144  
 Зрение 82, 145—156  
 — порог чувствительности 145, 146  
 — цветное 145, 154, 155  
 — черно-белое 145  
 Зрительные диски 146, 147
- Импульсный радиолиз 93—95, 128  
 — фотолиз 66—68, 92—95, 128  
 Ингибиторы фотореакций 128  
 — антиоксиданты 95, 134, 143, 156  
 — кислород 95, 100, 118  
 — ловушки радикалов 95, 135  
 — парамагнитные ионы 95, 118  
 — тушители  $^1\text{O}_2$  122—124, 126, 156  
 Индолин 136  
 Индол-5,6-хинон 136  
 Индометацин 135  
 Инсулин 107  
 Интеграл перекрытия спектров 72, 78  
 Интегрирующая сфера Ульбрихта 23  
 Интенсивность света 8  
 — хемилюминесценция 180  
 Инфаркт 174, 178  
 Иодопсины 154, 155  
 Ионол 95, 134, 143, 156, 181, 182  
 Ишемическая болезнь сердца 57, 178, 183
- Капилляры 131  
 Карнозин 181, 182  
 $\beta$ -Каротин 94, 95, 123, 124, 139  
 Каротиноиды 79, 93  
 Карциномы эпидермальные 138  
 Каталаза 141, 171, 174  
 Качественный анализ  
 — спектрофлуориметрический 30, 34  
 — спектрофотометрический 20  
 Квантовый выход  
 — интерконверсии ретиналя 156  
 — люминесценции 32, 34, 50—53, 169  
 — рубрена 161  
 — флуоресценции 32, 54, 72  
 — 1-анилинонафтален-8-сульфоната 41  
 — влияние растворителя 40, 41, 123  
 — нуклеотидов 97  
 — триптофана 123  
 — фотогенерации  $^1\text{O}_2$  126, 127  
 — фотохимической реакции 83, 84, 125  
 — аминокислот 102, 107  
 — димеризации тимина 99  
 — окисления этиллинолеата 111  
 — предельный 125, 127  
 — хемилюминесценции 168—170, 180  
 Кератиноциты 131, 137  
 Кетоны  
 — хемилюминесценция 166, 170  
 — фотолюминесценция 166  
 — фосфоресценция 170  
 Кинетическая энергия молекул 32, 33  
 Кислотно-основные свойства молекул 88—89  
 Кожа 27, 87, 95, 130—145  
 Колбочки 145, 154, 155  
 Колебательные уровни 8, 28, 29, 31, 33  
 Количественный анализ  
 — спектрофлуориметрический 30, 34, 35  
 — спектрофотометрический 12, 20—22  
 — погрешности 21—22  
 Коллаген 131

- Комплексы с переносом заряда (КПЗ) 90—91
- Конверсия  
— внутренняя 8, 29, 90  
— интеркомбинационная 8, 29, 90, 93
- Конканавалин А 175
- Кофермент Q 114
- Кристаллины 155
- Ксантин 170, 172, 173
- Ксантинооксидаза 170, 172, 173
- Лазер 140—141  
— заживление ран 141, 174
- Лейкоциты 174, 176, 178
- Лектины 175
- Лизин 101
- Лизосомы 109
- Лизоцим 107
- Лимфоциты 102, 175
- Линолевая кислота 109
- Линоленовая кислота 109, 115, 116
- Липиды ненасыщенные  
— спектры поглощения 14, 109  
— фотоокисление 109—116, 138, 139, 143  
— цепные реакции окисления 109—111, 134, 135, 157, 179—183
- Липопротеиды 57, 76, 182, 183
- Липосомы 41, 63, 74, 129, 180, 181
- Липофиллин 76
- Ловушки свободных радикалов 95, 118, 124, 156
- Ловушки синглетного кислорода 124, 156
- Люминесценция 9, 27  
— индуцированная светом 104, 158
- Люминол 172—176, 179
- Люцифераза 161, 183—187
- Люциферин 161, 162, 183, 184
- Люциферинаденилат 162
- Макрофаги 170, 174—179
- Малоновый диальдегид 112
- Меланин 131, 135, 142  
— биосинтез 136, 137
- Меланосомы 131, 136, 137
- Меланоциты 131, 136, 137
- Мелиттин 74
- Мембраны  
— биологические 151  
— ионная проницаемость 109, 115, 139, 151  
— микровязкость 57, 62, 147  
— разность потенциалов 56, 151  
— структура 75, 76, 147  
— фотоповреждение 108—116, 143  
— липидные 74—76
- Метиленовый синий 125—127, 129
- Метилэтилкетон 166
- Метионин 101, 139
- 8-Метоксисорален 91, 115, 116, 127, 129, 143, 155  
— фотогенерация  $^1\text{O}_2$  126
- $\tau$ -Метрия 47  
— однофотонная 47—50  
— фазовая 50  
— фосфоресценции 65—68
- Миграция энергии 9, 70, 80
- Миелопероксидаза 176
- Микровязкость 57, 62, 64
- Микроспектрофотометрия 154
- Микротрубочки 137
- Микрофиламенты 137
- Минимальная эритемная доза 87, 132, 133, 143
- Миоглобин 174, 185
- Митохондрии 42, 55, 56, 76, 109, 115, 147, 152, 180, 181
- Миелин 76
- Молярный коэффициент поглощения 10, 11, 20, 21, 33, 45, 53, 65  
— ацетона 18  
— гемоглобина 26  
— триплетных молекул 93
- Моноциты 170, 174, 175, 179
- НАДН-ФМН-Оксидоредуктаза 186, 187
- НАДФН-Оксидаза 170
- Нафталин 77
- $\beta$ -Нафтиламин 89
- $\alpha$ -Нафтол 156
- Нейтрофилы 175—179
- Низкотемпературные методы 94
- Нуклеиновые кислоты,— действие УФ 96—102
- Нуклеотиды,— спектры поглощения 97
- Обменный интеграл 78
- Однонитевые разрывы ДНК 101
- Олеиновая кислота 109
- Олеилхолестерин (олеил-В-ХТЕ) 76
- Оптическая плотность 10—12, 19—25, 35, 37
- $\pi$ -Орбитали  
— разрыхляющие 88  
— связывающие 88
- Отражающая способность 27  
— кожи 133
- Палочки 145, 154  
— внутренний сегмент 145—147  
— наружный сегмент 146, 151—153
- Парамагнитные ионы 95, 118



- Параметр  $\beta$  125, 126, 128  
 Пептидные связи 18  
 Первичные фотопродукты 91—96  
 Перенос энергии 9, 42, 70—82  
 — индуктивно-резонансный 71—76, 99  
 — на кислород 122  
 — обменно-резонансный 76—79, 99, 100  
 — полупроводниковый 80—81  
 — экситонный 79—80  
 Пероксиды 127, 161, 162, 166, 184  
 — ароматических аминокислот 106  
 — водорода 141, 157, 170, 171, 172, 174, 176, 183  
 — ненасыщенных липидов 16, 109—113, 129, 134, 135, 147, 162, 167, 171, 179—183  
 Пигментация 130, 135—137, 139, 142, 143  
 — непрямая 135—137  
 — прямая 136, 137  
 Пигментный эпителий 146  
 Пиперидины 124  
 Пипольфен 181, 182  
 Пирен 56, 57, 75  
 Пиридиннуклеотиды 114  
 Плазма крови 57, 171, 174, 182, 183  
 Поглощение света 8, 9, 82  
 — коэффициент 10—12, 34, 35, 41  
 — молярный коэффициент 10, 11, 15, 20  
 — поперечное сечение 10, 11, 20  
 Полимиксин 177  
 Полиморфноядерные лейкоциты 176  
 Политимидиновая кислота 98, 99  
 Поляризация люминесценции 36, 58—64, 70, 99  
 Поперечное сечение  
 — инактивации ферментов 85, 103  
 — поглощения 10, 11, 20, 85  
 — фотохимической реакции 85  
 — аминокислот 102, 103  
 Порфирины 66, 69, 117, 130, 144, 145  
 Потенциал ионизации 95  
 Потенциальная энергия молекул 32, 33  
 Потенциальная яма 16  
 Поток излучения 10  
 Правило  
 — Капи 30  
 — Левшина 30, 31  
 — сумм Куна—Томаса 15  
 Принципы  
 — Паули 17  
 — Франка—Кондона 32—34, 88  
 Производное гематопорфирина 144  
 Прометазин 140  
 Прооксиданты 181  
 Пропускание света 9—12, 19  
 Простагландины 135  
 Протопорфирин 117, 126, 127, 138, 139  
 Псоралены 17, 117, 128, 130, 142, 143  
 — бактерицидный эффект 120  
 — межнитевые спивки в ДНК 119  
 — мутагенный эффект 120  
 — производство вакцин 120  
 — свободные радикалы 119  
 — терапия 117, 142—144, 155  
 — фотогенерация  $^1\text{O}_2$  126  
 — фотоокисленные 128, 129  
 — фотоприсоединение — к белкам 155  
 — к ДНК 117, 119, 120, 143, 144  
 — к тимину 118—120  
 Псориаз 117, 130, 142, 143  
 ПУФА-Терапия 117, 142—144, 155  
 Радиохемилюминесценция 157  
 Радиус Ферстера 74—75  
 Рак легких 182  
 Распределение нормальное 20  
 Рассеяние света 23, 26, 27, 132  
 Реабсорбция флуоресценции 70, 73  
 Реактив Фентона 171, 172  
 Репарация аддуктов псорален-ДНК 120  
 Ретиналь 16, 146, 147, 156  
 — фотогенерация  $^1\text{O}_2$  156  
 — *цис-транс*-фотоизомеризация 147—149, 156  
 Рецепторные потенциалы 145, 150—155  
 Рибофлавин 126  
 Роговица глаза 155  
 Роговой слой эпидермиса 131, 134  
 Родопсин 88, 146, 147  
 — фотопревращения 149, 150, 152  
 — фотогенерация 150  
 Рубрен 161  
 Саркомы 138  
 Саркоплазматический ретикулум 56, 75  
 Сверхслабые свечения 157  
 Светофильтры скрещенные 35, 36  
 Свободные радикалы 91, 94, 108  
 — гидроксильные 95, 141, 157, 164, 170—174, 176  
 — гидропероксидные 170, 171  
 — глицина 107, 108  
 — карбонильные 164, 165, 172, 173  
 — ловушки 95, 110, 118, 135, 143  
 — люминола 173  
 — ненасыщенных липидов 110, 115, 179—183  
 — нитроксидные 124  
 — пероксидные 106, 110, 124, 162, 166, 170, 179  
 — псораленов 118, 119, 143  
 — рекомбинация 105, 106, 108, 110, 158—162, 164, 166, 172  
 — спиновые аддукты 95, 96  
 — спиновые ловушки 95, 96

- супероксид 121, 136, 141, 157, 170—178
  - тирозина 104—106, 158
  - триптофана 104—106, 158
  - фенилаланина 105, 106
  - формильные 164, 165
  - флорпромазина 120
  - цистеина 106
  - цистина 106, 117
  - Семихиноны 137
  - Сенсибилизированная
    - флуоресценция 71, 73, 79
    - фосфоресценция 78
    - фотохимическая реакция 71, 100, 107, 109, 112, 116—129, 155, 156
  - Серин 101
  - Сетчатка глаза 145, 146, 154, 155
  - Сила осциллятора 15
  - Силикоз 178
  - Синглетный кислород 79, 91, 121—127, 139, 156, 157, 163, 171, 172, 176
  - Сольватация 38, 39
  - Сольватированный электрон 95, 104, 105, 117, 118, 120, 121, 158, 159
  - Сонолюминесценция 28, 157
  - Соотношение де Бройля 16
  - Сопряженные двойные связи 16, 17, 88, 147
  - Сосочковый слой кожи 131
  - Спектральная ширина щелей монохроматора 20
  - Спектрин 139
  - Спектрофлуориметры 35—38
  - Спектрофотометры 18—20
  - Спектры
    - возбуждения
      - флуоресценции 36, 41—43, 64, 73
      - белков 42
      - триптофана 64
      - фосфоресценции 64
      - триптофана 64
      - действия 83—87
    - бактерицидного эффекта 96
    - димеризации тимина 99
    - загара 136, 137
    - канцерогенеза 137
    - мутаций 86, 96
    - фотоинактивации ферментов 85, 86
    - фотопериодизма утят 87
    - эритемы 87, 132—134, 139
    - люминесценции 30, 36, 43
    - синглетного кислорода 123
    - отражения 26, 27, 154
    - поглощения 13—16, 20, 33
    - антрацена 31
    - белков 42
    - билирубина 144
    - влияние растворителя 14, 39
    - влияние рН 88, 89
  - диметиламинохалкона 38
  - ДНК 86
  - иодопсинов 154
  - каротиноидов 14
  - колбочек 154
  - ненасыщенных жирных кислот 14, 109
  - нуклеотидов 97
  - пептидной связи 102
  - переходные 67, 92—94
  - положение максимума 16—18, 20
  - полуширина 14, 15, 20, 53
  - продуктов окисления липидов 111, 112
  - протопорфирина 139
  - псораленов 118, 119
  - разностные 19, 21—23
  - ретиналя 14
  - родопсина 154
  - серосодержащих аминокислот 102
  - сольватированного электрона 104, 159
  - супероксиддисмутазы 141
  - $\alpha$ -токоферола 110, 134
  - триплетных молекул 65, 93, 94
  - триптофана 39, 40, 67
  - фотореактивирующего фермента 140
  - хлорпромазина 120
  - поляризации флуоресценции
    - по возбуждению 60
    - по излучению 60, 63
  - триптофана 60
  - N-фенил-1-нафтиламина 63
  - пропускания 13
  - кожи 130
  - флуоресценции 30, 31, 33
  - акридинового оранжевого 56
  - антрацена 31
  - влияние растворителя 29, 38—40
  - влияние рН 88, 89
  - диметиламинохалкона 38
  - пирена 56, 57
  - полуширина 34
  - триптофана 39, 40
  - фосфоресценции 30, 65
  - хемиллюминесценции 166, 167, 176, 179, 180
  - ЭПР спиновых аддуктов 96
- Спин электрона 8, 17, 29, 64
- Спиновые аддукты и ловушки 95, 96
- Сродство к электрону 95, 106
- Стационарные условия облучения 91, 124, 149
- Степень покраснения кожи 132, 133
- Степень поляризации флуоресценции 58, 59, 61
- предельная 59, 70
- Субмитохондриальные частицы 76

- Сульфаниламиды 130, 140  
 Супероксиддисмутаза 141, 142, 171, 174, 176  
 Супероксидрадикал 121, 136, 141, 157, 170—178  
 Шивки ДНК—белок 101
- Термолюминесценция 28, 105, 157, 158, 164  
 Тетрацен 79  
 Тетрациклины 130  
 Тетраоксид 162  
 Тимин 97, 98, 100, 118, 119  
 Тиминовые димеры 79, 97—100  
 — фотомономеризация 98, 99, 140  
 Тирозин 75, 76, 86, 101—104, 107, 108, 117, 131, 136, 139, 158, 159  
 Тирозиназа 131, 136, 137  
 $\alpha$ -Токоферол 110, 115, 118, 124, 127, 133, 134, 143  
 Триболоминесценция 28, 157  
 Триеновые конъюгаты 16, 112  
 Трипсин 74, 86, 104, 107  
 Триптофан 17, 39, 40, 60, 61, 64, 65, 67, 75, 76, 79, 86, 88, 89, 101—104, 107, 117, 129, 139, 155, 158, 159  
 Тромбозы 183  
 Туберкулез 182  
 Тучные клетки 131  
 Тушение  
 — люминесценции  
 — — концентрационное 55  
 — — температурное 68, 69  
 — синглетного кислорода 122, 123, 124, 126, 156  
 — флуоресценции 51, 52, 55, 75, 170  
 — — динамическое 53, 54, 55, 71  
 — — статическое 53, 54, 55  
 — фосфоресценции 65, 68, 69, 78, 170  
 — хемилюминесценции 165, 169  
 — электронно-возбужденных состояний 51, 68  
 — — синглетных 122  
 — — триплетных 78, 79, 93, 95, 100, 118, 123  
 Тяжелая вода 123
- Ультрафиолет  
 — бактерицидное действие 82, 96, 98  
 — гемолитический эффект 112, 113  
 — канцерогенное действие 82  
 — летальное действие 86  
 — мутагенное действие 82  
 — пигментация 82  
 — синтез витамина D 82  
 — терапевтический эффект 82  
 — эритемогенность 82  
 — УФА 117, 118, 132, 133, 140  
 — УФА 132, 133, 141, 142  
 — УФС 132, 133  
 Уравнение  
 — Больцмана 28, 29  
 — Декстера—Ермолаева 77  
 — Перрена—Яблонского 59, 61  
 — Ферстера 72, 73, 99  
 — Штерна—Фольцмера 51, 52, 68, 71, 93, 126, 169, 170  
 Урацил 97, 100, 101  
 Уртикария 140  
 Условие  
 — индукции 71  
 — резонанса 71, 72, 77
- Фагоцитоз 175  
 Фагоциты 141, 170—172, 174—179  
 Фенилаланин 28, 79, 101, 102, 104  
 N-Фенил-1-нафтиламин 63  
 С-Фенил-N-третбутилнитрон 95, 96  
 Фенотиазины 130  
 Феромоны 186  
 Фибробласты 102  
 Фитогемагглютинин 175  
 Флавины 114, 184—187  
 Флуоресцентные зонды 40, 41, 56, 57, 62, 74, 75  
 — метки 40  
 Флуоресценция 8, 9  
 — деполяризация 61, 62, 71  
 — димеров 56  
 — замедленная 68, 69  
 — индуцированная светом 104, 159  
 — КПЗ 90  
 — сенсibilизированная 71  
 — эксимеров 56, 57  
 Формилкинуренин 108  
 Фосфодиэстераза 153  
 Фосфоресценция 8, 9, 30, 64—68, 77  
 — диацетила 78  
 — индуцированная светом 104, 159  
 — КПЗ 90  
 — при комнатной температуре 66  
 — сенсibilизированная 77, 78  
 Фосфороскоп 65, 66  
 Фотоаллергические эффекты 130, 131, 140  
 Фотобиологические процессы 82  
 Фотогидратация 97, 100, 101  
 Фотодинамические  
 — красители 117, 138  
 — эффекты 117, 139  
 Фотоизомеризация  
 — билирубина 144  
 —  $\beta$ -каротина 123  
 — ретинала 147—149  
 Фотоионизация 104, 108, 117, 158

Фотоканцерогенез 137, 138  
Фотолюминесценция 28  
Фотомедицина 130  
Фотомутагенез 120  
Фотоперенос  
— водорода 121  
— электрона 121  
Фотопериодизм 87  
Фотоприсоединение  
— псораленов 117—120, 143, 155  
— хлорпромазина 120, 121, 140  
Фотореактивация  
— каталазы 141, 174  
— поврежденный ДНК 101, 102  
— супероксиддисмутазы 141, 142  
— эритемы 135  
Фотореактивирующий фермент 101, 102, 135, 140  
Фотореакции 121  
Фотосенсибилизаторы 116—129  
Фотосинтез 82, 89, 185  
Фототаксис 82  
Фототерапия 130, 140—145  
Фототоксические эффекты 130, 131, 139, 142  
Фототропизм 82  
Фотофизические процессы 9  
Фотохимическая люминесценция 157, 182  
Фотохимиотерапия 117, 140—145  
— локальная 142  
— системная 142  
Фотохимическое последствие 111  
Фурукумарины 94, 117, 130, 142, 143, 155, 156

Хемилюминесценция 28, 106, 110, 111, 157—187  
— активация 79, 129, 168, 169, 172, 176, 178, 180, 182  
— квантовый выход 168—170  
— латентный период 182  
— при окислении липидов 129  
— псораленов 128, 129  
— регистрация 165, 167  
— энергия активации 159  
Хлоропласты 55, 80  
Хлорофилл 79, 80, 124, 126  
— фотовосстановление 89  
Хлорпромазин 120, 121, 130, 140  
Хлортетрациклин 186  
Холеста-5,7,9[11]триен-3 $\beta$ -ол (В-ХТЕ) 76  
Холестерин 57, 63, 76, 138  
Холестерин-5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -эпоксид 138  
Хронический грануломатоз 178  
Хрусталик 155, 156

Ценные реакции 83, 106, 109, 110, 134, 135, 157, 162, 166, 169, 179  
Цианиновые красители 56  
Циклогексан 168  
Цистеин 95, 102, 106, 118  
Цистеинсульфоновая кислота 107  
Цистин 86, 95, 101—104, 106—108, 117  
Цитозин 97, 100, 101  
Цитохромы 76, 138

Эдема 127, 130, 133, 139, 140, 142  
ЭДТА 174  
Эйнштейн 7  
Экворин 184  
Экзема 140  
Эксимеры 56, 57  
Эксплексы 91  
Экситон 79, 80  
Эластин 131  
Электролюминесценция 28  
Электронная микроскопия 75, 137  
Электронно-возбужденные состояния  
— донорно-акцепторные свойства 89, 90  
— кетонов 163  
— кислотно-основные свойства 88, 89  
— разрыхляющие 88, 147  
— связывающие 88, 147  
— синглетные 8, 15, 28, 29, 30, 32, 33, 77, 159  
— схема уровней 8, 9, 18, 29, 30, 64, 77, 100, 158, 159  
— триплетные 8, 29, 30, 33, 64—69, 77, 100, 121, 159  
Электронные переходы 28  
— безызлучательные 8, 9, 27, 29, 32, 50, 53, 77  
— вектор 58, 61, 147  
— излучательные 8, 9, 27, 29, 30, 32, 50, 77  
— при поглощении 8, 9, 15, 17, 18, 20, 27, 29, 32, 77  
— — синглет-триплетные 65  
— — триплет-триплетные 66—68  
— с переносом заряда 90  
— схема 8, 9, 18, 29, 30, 50, 51, 77, 90, 148, 159  
Электронный парамагнитный резонанс 94—96, 116, 119, 124, 128, 164  
— импульсный 94  
*n*-Электроны 17, 18, 97  
*p*-Электроны 16—18, 88, 97, 147  
 $\sigma$ -Электроны 18, 147  
Электроретинография 150, 151  
Электрохимическая люминесценция 157  
Эозин 68, 69, 126, 127  
Эпидермис 129—133, 135, 137, 142  
Эритема 27, 127, 130, 132—135, 139, 140  
— ПУФА 142, 143

- УФА 132, 135
- УФВ 133—135
- УФС 133, 135
- Эритемная эффективность 132, 133
- Эритроциты 24—26, 76, 109, 112, 115, 121, 127, 129, 139, 184
- Этилбензол 166, 168
- Эффект внутреннего фильтра 43
- реабсорбции 34, 43, 44—46
- светорассеяния 23, 24
- сита 23—26
- экранировки 34, 42—44, 87, 134
- Эффективность действия света 86
- фотопериодизм 87
- эритемная 87
- Яйца морского ежа 109**

# ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие . . . . .	3
Введение . . . . .	5
<i>Раздел I</i>	
<b>Фотофизические процессы в молекулах. Свойства электронно-возбужденных состояний молекул . . . . .</b>	<b>7</b>
<b>Глава 1. Взаимодействие фотонов с биологически важными соединениями . . . . .</b>	<b>7</b>
1.1. Характеристики светового излучения. Электронные переходы в молекулах . . . . .	7
1.2. Поглощение монохроматического света растворами . . . . .	9
1.3. Спектры пропускания и спектры поглощения . . . . .	13
1.4. Спектры поглощения и химическая структура биологически важных соединений . . . . .	16
1.5. Спектрофотометры . . . . .	18
1.6. Качественный и количественный спектрофотометрический анализ . . . . .	20
1.7. Разностная спектрофотометрия . . . . .	22
1.8. Искажения спектров в биологических объектах . . . . .	23
<b>Глава 2. Фотолюминесценция биологических систем . . . . .</b>	<b>27</b>
2.1. Явление люминесценции . . . . .	27
2.2. Электронные переходы в возбужденной молекуле и основные законы люминесценции . . . . .	28
2.3. Электронные переходы и колебания ядер. Принцип Франка—Кондона . . . . .	32
2.4. Связь интенсивности люминесценции с концентрацией вещества. Люминесцентный анализ . . . . .	34
2.5. Приборы для регистрации люминесценции. Флуориметр со светофильтрами . . . . .	35
2.6. Влияние микроокружения на спектры и квантовые выходы люминесценции. Флуоресцентные зонды . . . . .	38
2.7. Спектры возбуждения люминесценции . . . . .	41
2.8. Эффект экранировки люминесценции . . . . .	42
2.9. Явление реабсорбции люминесценции . . . . .	44
2.10. Время жизни возбужденного состояния молекул . . . . .	46
2.11. Связь квантового выхода со временем жизни возбужденного состояния молекул . . . . .	50
2.12. Статическое и динамическое тушение флуоресценции . . . . .	53
2.13. Флуоресценция димеров и эксимеров . . . . .	56
2.14. Поляризация люминесценции . . . . .	58
2.15. Триpletное состояние биомолекул. Фосфоресценция . . . . .	64
2.16. Измерение спектра, $\tau$ фосфоресценции и поглощение молекул в tripletном состоянии . . . . .	65
2.17. Замедленная флуоресценция . . . . .	68
<b>Глава 3. Перенос энергии электронного возбуждения . . . . .</b>	<b>70</b>
3.1. Явление переноса энергии . . . . .	70
3.2. Теория индуктивно-резонансного переноса энергии . . . . .	71
3.3. Использование индуктивно-резонансного переноса энергии для оценки расстояния между молекулами . . . . .	72

3.4. Обменно-резонансный перенос энергии . . . . .	76
3.5. Перенос энергии в кристаллах . . . . .	79
<b>Раздел II</b>	
<b>Первичные стадии фотобиологических процессов . . . . .</b>	<b>82</b>
<b>Глава 4. Основные закономерности и экспериментальные методы в фотохимии . . . . .</b>	<b>82</b>
4.1. Фотобиологические процессы и их стадии . . . . .	82
4.2. Фотохимический спектр действия . . . . .	83
4.3. Изменение свойств молекул в электронно-возбужденном состоянии . . . . .	88
4.4. Комплексы с переносом заряда . . . . .	90
4.5. Методы изучения первичных фотопродуктов . . . . .	91
<b>Глава 5. Фотохимическое повреждение нуклеиновых кислот, белков и липидов биомембран . . . . .</b>	<b>96</b>
5.1. Действие УФ-излучения на нуклеиновые кислоты . . . . .	96
5.2. УФ-повреждение белков и аминокислот . . . . .	102
5.3. Природа первичных фотопродуктов ароматических аминокислот . . . . .	104
5.4. Действие ультрафиолета на биологические мембраны . . . . .	108
<b>Глава 6. Механизм фотосенсибилизированных реакций в биологических системах . . . . .</b>	<b>116</b>
6.1. Фотосенсибилизированные реакции, не нуждающиеся в кислороде . . . . .	117
6.2. Фотодинамические эффекты с участием синглетного кислорода . . . . .	121
6.3. Другие механизмы фотосенсибилизированного окисления . . . . .	127
<b>Глава 7. Фотобиологические процессы в коже. Фотомедицина . . . . .</b>	<b>130</b>
7.1. Эритема . . . . .	132
7.2. Пигментация кожи (загар) . . . . .	135
7.3. Фотоканцерогенез . . . . .	137
7.4. Фототоксические эффекты протопорфиринов . . . . .	138
7.5. Фотоаллергия . . . . .	140
7.6. Фото- и фотохимиотерапия . . . . .	140
<b>Глава 8. Биофизические основы зрения . . . . .</b>	<b>145</b>
8.1. Устройство глаза и его чувствительность к свету . . . . .	145
8.2. <i>цис-транс</i> -Фотоизомеризация ретиналя . . . . .	147
8.3. Фотопревращение родопсина . . . . .	149
8.4. Рецепторные потенциалы . . . . .	150
8.5. Цветное зрение . . . . .	154
8.6. Фотоповреждение глаз . . . . .	155
<b>Глава 9. Хемилюминесценция в биологических системах . . . . .</b>	<b>157</b>
9.1. Молекулярные механизмы образования возбужденных молекул при хемилюминесценции. Рекомбинационное свечение . . . . .	158
9.2. Механизм некоторых хемилюминесцентных реакций в растворах . . . . .	160
9.3. Изучение механизма хемилюминесцентных реакций. Свойства молекул продуктов, образующихся в возбужденном состоянии . . . . .	163
9.4. Хемилюминесценция, сопровождающая образование активных форм кислорода . . . . .	170
9.5. Хемилюминесценция при активации фагоцитов . . . . .	174
9.6. Хемилюминесценция при пероксидном окислении липидов . . . . .	179
9.7. Биолюминесценция и ее аналитическое применение . . . . .	183
Литература . . . . .	188
Предметный указатель . . . . .	190

*Учебное издание*

**Владимиров** Юрий Андреевич  
**Потапенко** Александр Яковлевич

**ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ  
ФОТОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ**

Зав. редакцией С. Ф. Кондрашкова. Редактор С. С. Трапезникова. Мл. редакторы С. М. Ерохина, Л. С. Макаркина. Художественный редактор Е. Д. Косырева. Художник В. М. Боровков. Технический редактор Н. А. Битюкова. Корректор С. К. Завьялова

ИБ № 7979

Изд. № ХИМ—874. Сдано в набор 25.05.88. Подп. в печать 14.12.88. Формат 60×88<sup>1/16</sup>. Бум. офс. № 2. Гарнитура таймс. Печать офсетная. Объем 12,25 усл. печ. л. 12,5 усл. кр.-отт. 12,95 уч.-изд. л. Тираж 5000 экз. Зак. № 1136. Цена 45 коп.

Издательство «Высшая школа», 101430, Москва, ГСП-4, Неглинная ул., д. 29/14.

Отпечатано с диапозитивов ордена Октябрьской Революции и ордена Трудового Красного Знамени МПО «Первая Образцовая типография» «Союзполиграфпрома» при государственном комитете СССР по делам издательств, полиграфии и книжной торговли, 113054, Москва, Валовая, 28 в Московской типографии № 8. «Союзполиграфпрома» при Государственном комитете СССР по делам издательств, полиграфии и книжной торговли, 101898, Москва, Центр, Хохловский пер., 7.