

<https://doi.org/10.3176/biol.1982.2.01>

УДК 577.3:535.37

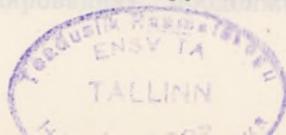
Наталья АРХАНГЕЛЬСКАЯ

СВЕРХСЛАБАЯ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ МОДЕЛЬНЫХ И БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМ

Многие биохимические реакции, имеющие экзотермические стадии, протекают с выделением энергии. В таких реакциях, как правило, присутствуют молекулы с избытком энергии, т. е. находятся в неравновесно возбужденных состояниях. Деактивация возбуждения осуществляется различными физическими путями, и если даже часть актов деактивации возбужденных частиц происходит путем излучения, возникает хемилюминесценция. Теоретически существует вероятность возникновения хемилюминесценции на любой экзотермической стадии биохимической реакции.

Способность живых организмов светиться в видимой области спектра известна еще со времен Аристотеля. Так называемая биолюминесценция впервые описана в его книге «Животные» в IV веке до н. э. В настоящее время выяснено, что природа этого свечения обусловлена специализированной ферментативной реакцией окисления, при которой путем взаимодействия люциферина и люциферазы происходит распад АТФ, сопровождающийся высвечиванием. Уже давно высказывались предположения, что помимо этого специализированного излучения в биологических системах существует слабое излучение универсального типа, свойственное всем клеткам и являющееся отражением протекающих в клетках энергетических процессов. Основой для таких предположений служили не только теоретические рассуждения, но и практические результаты, свидетельствующие о том, что многие окислительные реакции сопровождаются хемилюминесценцией (Шляпников и др., 1966). Появление высокочувствительных фотометрических установок стимулировало поиски собственного излучения живых клеток. Но еще до этого в литературе появились сообщения об открытии двух типов излучения клеток. В. Лепешкин (Lepeschkin, 1934) с помощью специальных фотопластинок обнаружил очень слабое излучение в ультрафиолетовой области, сопровождающее гибель клеток при воздействии на них сильными химическими агентами, которое он назвал некробиотическим. Примерно в это же время А. Г. Гурвич (Гурвич, 1934) сообщил об очень слабом ультрафиолетовом излучении животных тканей, которое он наблюдал при помощи биологического детектора. Он полагал, что биологическое ультрафиолетовое излучение стимулирует митоз в биологических детекторах (дрожжах, корешках лука), в связи с чем такое излучение было названо митогенетическим. Позднее ультрафиолетовое митогенетическое излучение было зафиксировано высокочувствительными счетчиками фотонов, а также фотоумножителями, при этом сигнал превышал шумы установок всего лишь на 20—60%.

В 1954 г. итальянские астрофизики А. Колли, У. Факкини и А. Росси (Colli и др., 1954) с помощью фотоэлектронных установок обнаружили, что растущие корешки злаковых излучают в видимой области спектра сверхслабый световой поток. В 1961 г. Б. Н. Тарусов и его



сотрудники (Тарусов и др., 1961) обнаружили, что печень и мышцы живых мышей испускают сверхслабые лучи в видимой области спектра. В последующих работах они доказали, что в этой области спектра светятся также гомогенаты тканей, липиды, экстрагированные из них, растительные жиры и жирные кислоты (Тарусов и др., 1967). За прошедшие с того времени годы опубликовано несколько сот работ, посвященных проблемам изучения механизма сверхслабой хемилюминесценции живых организмов в видимой области спектра и возможности ее практического применения. Исследователей особенно привлекала возможность использования свечения в качестве метода, с помощью которого можно получить информацию о процессах, протекающих в объекте, не внося в него дополнительных возмущений. Вполне понятно, что объем получаемой информации прямо пропорционален объему знаний о механизме свечения и совершенству техники и методики хемилюминесцентного анализа.

Следует отметить, что как приоритет в открытии сверхслабого свечения животных объектов, так и преобладающая часть работ, в которых освещены различные стороны проблемы биохемилюминесценции, принадлежат советским ученым. Однако в нашей республике метод хемилюминесцентного анализа процессов, протекающих в биологических системах, практически не нашел применения. Все сказанное и обусловило появление настоящего обзора.

Техника измерения сверхслабой хемилюминесценции

Основной трудностью при изучении сверхслабых свечений является чрезвычайно малая их интенсивность (порядка сотен квантов в секунду с 1 см^2 излучающей поверхности). Для регистрации таких световых потоков необходима специальная аппаратура, усиливающая сигнал, главной составной частью которой служит фотоэлектронный умножитель. При работе с биологическими объектами в нашей стране чаще всего используют фотоумножители типа ФЭУ-37, ФЭУ-42, ФЭУ-79 и ФЭУ-85, обладающие максимальной спектральной чувствительностью в видимой области спектра, темновой ток которых низок благодаря отклонению шумовых электронов специальными электростатическими линзами. В последние годы разработан новый фотоумножитель типа ФЭУ-130 («Квантакон»), предназначенный для регистрации сверхслабых излучений в режиме счета одноэлектронных импульсов (Александров и др., 1977). Питание фотоумножителей осуществляется с помощью высоковольтных стабилизаторов напряжения, в которых отклонение выходного напряжения не превышает 0,5%. Дополнительное усиление сигнала проводится широкополосными усилителями. С выхода усилителя сигнал поступает через интегратор счета импульсов на самописец или прямо на счетчик импульсов для получения абсолютных значений интенсивности свечения в определенный момент времени.

В последние годы наметился переход от создания отдельных экземпляров установок для регистрации сверхслабого свечения, существенно различающихся как по конструкции, так и по чувствительности, к серийному производству хемилюминометров — приборов, обладающих высокой чувствительностью, широким спектральным диапазоном, разнообразием способов выведения и регистрации оптической информации, возможностью исследования спонтанного свечения и свечения, стимулированного различными добавками. В Киеве разработан первый отечественный хемилюминометр «Свет», рекомендованный для серийного производства. Область спектральной чувствительности этого прибора 160—830 нм. Установка может работать в режиме прерыва-

ния светового потока с автоматическим вычитанием фона и в режиме непрерывной записи кинетики хемилюминесценции. Одним из достоинств прибора является возможность измерения интенсивности свечения в *квант/сек·см²*, которая обеспечивается наличием эталона яркости ЭЯ-1. Наличие эталона яркости и ФЭУ, работающего в одноэлектронном режиме, со спектральными характеристиками, близкими к таковым хемилюминесценции биологических объектов (ФЭУ-130), компенсация фона и термостабилизация ФЭУ и проб (осуществляющаяся универсальным термостатирующим устройством «Биостат» с широким диапазоном статирования (37, 25 и —5°С) ставят измерение хемилюминесценции на объективную метрологическую основу (Сидорик и др., 1978). Дополнительно к этому в настоящее время проводятся работы по созданию типовой системы автоматизированной обработки хемилюминесцентной информации на основе использования мини-ЭВМ (Мазур, Ратманский, 1978).

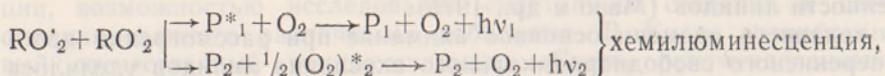
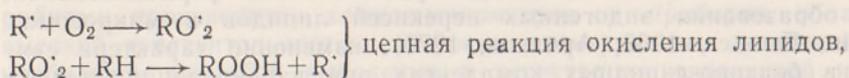
Механизм хемилюминесценции при перекисном окислении липидов

Уже в ходе первых исследований было установлено, что сверхслабое свечение в видимой области спектра является универсальным и спонтанно испускается всеми живыми клетками. У пигментированных объектов излучение сначала не было обнаружено, однако впоследствии выяснилось, что это связано с его поглощением внутриклеточными пигментами. Если эти пигменты удалить, например, при выращивании этиолированных листьев, или применить фотоумножители, работающие в области отражения этих пигментов (в длинноволновой части спектра), то излучение проявляется (Агавердиев, Тарусов, 1965). Изучение влияния кислорода на хемилюминесценцию показало, что в бескислородной среде свечение исчезает. Исследования с фракционированием клеточных гомогенатов выявили, что в основном излучает фракция, содержащая липиды. Это дало основание предположить, что свечение тканей обусловлено спонтанным окислением липидов и имеет, таким образом, неферментативную природу (Тарусов и др., 1962).

Перекисное окисление липидов как в модельных, так и в живых системах идет по свободнорадикальному цепному механизму. Многочисленными исследованиями установлено, что интенсификация перекисного окисления липидов — это неспецифическая реакция поражения важнейших мембранных структур клетки, развивающаяся при различных патологиях, таких как злокачественный рост, канцерогенез, при действии ионизирующей радиации, авитаминоз, интоксикация, воспалительные процессы. Однако в литературе накапливается все больше данных, указывающих на вполне определенную роль перекисей липидов (а возможно, и некоторых других продуктов их автоокисления) в функционировании клеточных образований в норме. Так, обнаружено изменение уровня липоперекисей в процессе клеточного деления (Garber, Wilbur, 1957), регулирующее влияние концентрации экзогенных липоперекисей на активность некоторых ферментативных систем (Christophersen, 1968; Wills, 1971), существование ферментативной системы образования эндогенных перекисей липидов в микросомах (Hochstein, Ernster, 1963; Арчаков, 1975), изменение характера связывания в белково-липидных комплексах при варьировании степени окисленности липидов (Мазо и др., 1975).

До недавнего времени основное внимание при рассмотрении проблемы перекисного свободнорадикального окисления липидов уделялось выяснению химизма этого процесса, включающего в силу своего цепного характера стадии зарождения (инициирования), продолжения

и разветвления цепи и обрыва ее. Сейчас вопрос о кинетике процесса в принципе решен. Выяснено, что как в модельных, так и в биологических системах важную роль в развитии кинетики процесса перекисного окисления липидов играют ионы двухвалентного железа. Считается, что заметное перекисное окисление может идти лишь в присутствии этих ионов, а регуляция его заключается в регулировании реакций, приводящих к образованию ионов Fe^{2+} в системе, их связыванию или окислению (Владимиров, Арчаков, 1972). Так, в случае отсутствия ионов Fe^{2+} в системе, где имеются свободные радикалы R' , реакции окисления могут идти с неразветвленными цепями, и эти процессы могут проходить с замедлением или, если имеется постоянный источник радикалов, с постоянной скоростью. При наличии же ионов железа (Fe^{2+}) картина меняется. Разлагая продукты цепного окисления, ионы Fe^{2+} продуцируют новые радикалы, дающие начало новым цепям окисления. Скорость такой реакции с разветвленными цепями возрастает по экспоненте до тех пор, пока железо в системе не окислится. В биологических мембранах существуют две системы перекисного окисления липидов, различие между которыми в химическом отношении заключается в разных способах поддержания железа в восстановленном состоянии. Это — ферментативная система, т. е. НАДФН-зависимое перекисное окисление (НЗП), и неферментативная система — аскорбат-зависимое перекисное окисление (АЗП). Системы эти принципиально различаются на стадии иницирования: в случае НЗП ионы железа — центры радикалообразования — восстанавливаются цепью переноса электронов ферментативно, в неферментативной системе восстановление железа происходит под действием аскорбиновой кислоты и других восстановителей с подходящим редокс-потенциалом (Владимиров, Арчаков, 1972, с. 145). Наличие разных центров, иницирующих образование свободных радикалов, и следовательно, различие в их локализации, приводит к тому, что в этих системах используются разные молекулы ненасыщенных жирных кислот, т. е. в перекисное окисление вовлекаются различные области липидной фазы. Тем не менее кинетика реакций НЗП и АЗП одинакова, за исключением ранних стадий инициации, а именно, она лежит в основе механизма хемилюминесценции, сопровождающей перекисное окисление липидов как в модельных, так и в биологических системах. Первые указания на это были получены при сопоставлении кинетик хемилюминесценции, сопровождающей свободнорадикальное окисление ароматических углеводородов, и свечения липидов (первая тщательно изучена Р. Ф. Васильевым и его сотрудниками, см. например, Васильев, Вичутинский, 1962; Шляпинтох и др., 1966). Активирование свечения липидов при нагревании и облучении объекта, подавление хемилюминесценции антиоксидантами и отсутствием кислорода и кинетика свечения при отсутствии кислорода и последующем его поступлении — вспышка свечения, которую можно объяснить накоплением в системе в отсутствие кислорода радикалов типа R' и быстрым переходом их в радикалы RO_2' при наличии кислорода, дали возможность предположить, что и хемилюминесценция при автоокислении липидов связана с рекомбинацией (диспропорционированием) перекисных радикалов (Гарусов, Журавлев, 1965):



где P — продукт реакции, вероятно, карбонильное соединение.

Но одно дело — хемилюминесценция чистых соединений, например, ароматических углеводов или жирных кислот в растворах или в составе жиров, а другое — хемилюминесценция биологических систем, биологических мембран. Высокая структурная организация живой клетки может накладывать жесткие ограничения на потенциально возможные реакции, с одной стороны, и выявлять много новых возможностей, неизвестных для модельных систем, часто возникающих в сложном переплетении реакций клеточного метаболизма, с другой. Поэтому для доказательства высказанного выше предположения понадобились многие годы и многочисленные эксперименты на разных объектах с использованием различных методик. До самого последнего времени исследователями-мембранологами проводятся работы по выявлению связи между хемилюминесценцией клеточных мембран и процессом перекисного окисления в них. Однако основное положение можно считать доказанным и оно формулируется следующим образом: *реакции, ответственные за хемилюминесценцию биологических тканей, гомогенатов тканей, клеток, клеточных структур, включают в себя цепные реакции окисления, продуцирующие синглетный кислород, гидроперекисные радикалы и липоперекиси* (см. работы: Тарусов и др., 1961а, б, 1962, 1965, 1967; Владимиров, Арчаков, 1972; Орлов, 1975; Wright и др., 1979; Russel, Cormier, 1979; Takanaka, O'Brien, 1980 и др.). По способу доказательства этого положения опубликованные работы можно разделить на три группы: 1) работы по изучению действия активаторов и ингибиторов перекисного окисления липидов (ПОЛ) на хемилюминесценцию, 2) исследования спектрального состава хемилюминесценции, 3) работы, в которых проводится сопоставление кинетики ПОЛ с кинетикой хемилюминесценции, сопровождающей ПОЛ. Рассмотрим подробнее каждую из этих групп.

1. В начале использовались известные способы активации ПОЛ — нагревание (Тарусов и др., 1961а, б) и облучение (Тарусов и др., 1962), а в качестве ингибиторов ПОЛ — антиоксиданты β -ионол, α -нафтол (Журавлев и др., 1965; Тарусов, Журавлев, 1965) и токоферол (Иванов и др., 1972). Позже, когда был выяснен механизм аскорбат-индуцированного перекисного окисления, для изучения связи ПОЛ и хемилюминесценции использовались добавки аскорбата в качестве прооксиданта (Wright и др., 1979) в микросомах. В настоящее время активно разрабатывается гипотеза об участии на начальных стадиях инициации реакций ПОЛ активных форм кислорода, а именно, синглетного кислорода 1O_2 и супероксидного анион-радикала $^{\cdot}O_2^-$ (Мерзляк, Соболев, 1975; Lloyd и др., 1979; Russel, Cormier, 1979). Поэтому в качестве доказательства связи ПОЛ с хемилюминесценцией приводятся наблюдения параллельного ингибирования обоих процессов тушителями 1O_2 и $^{\cdot}O_2^-$ (Takanaka, O'Brien, 1980). Во всех исследованных случаях активация ПОЛ сопровождалась усилением свечения, а ингибирование перекисного окисления вызывало в свою очередь тушение свечения. Исключением являются работы по наблюдению вспышки свечения жирных кислот при добавлении к ним таких антиоксидантов, как β -меркаптопропиламин, β -меркаптоэтиламин, адреналин или лецитин, причем вспышка свечения объяснялась предположительно образованием возбужденных состояний в результате реакции рекомбинации перекисных радикалов жирной кислоты и антиоксиданта $ROO^{\cdot} + InOO^{\cdot} \rightarrow P^* \rightarrow P + h\nu$ (Журавлев, 1972). На наш взгляд, не исключено и другое объяснение. Роль антиоксиданта, содержащего аминогруппу, может заключаться в образовании не нового возбужденного состояния, а нового продукта, способного люминесцировать с большим квантовым выходом и выступать в качестве активатора хемилюминесценции. В пользу этого предположения можно привести пример образования флюо-

ресцирующих соединений с хромофорной группой типа шиффового основания в результате реакций перекисленных липидов с веществами, содержащими аминогруппу, — с белками, фосфолипидами, нуклеиновыми кислотами (Dillard, Tappel, 1973; Bidlack, Tappel, 1973). Ниже мы остановимся более подробно на участии подобных соединений в высвечивании кванта хемилюминесценции. Таким образом, кажущееся исключение в действительности подтверждает обусловленность хемилюминесценции процессом ПОЛ.

2. При изучении свечения, сопровождающего жидкофазное окисление углеводов, было показано, что продуктами окисления являются возбужденные молекулы кетонов и димеров кислорода. Этот вывод был сделан, во-первых, на основании совпадения спектров хемилюминесценции со спектрами фотолюминесценции кетонов, образующихся при диспропорционировании перекисных радикалов (Васильев, Русина, 1964а), и во-вторых, на основе того, что при окислении некоторых углеводов от 10 до 85% всей хемилюминесценции приходится на излучение в красной области спектра (Васильев, Русина, 1964б). Спектры испускания возбужденного кислорода при реакциях хемилюминесценции (большинство окислительно-восстановительных реакций неорганических соединений) достаточно хорошо изучены, они содержат характерные полосы в оранжевой, красной и инфракрасной областях (578, 630—633, 703, 762, 770, 900, 1100 и 1300 нм) спектра (Vassiljev, 1967; Stauff и др., 1963), и это позволяет отделить «кислородное» излучение от излучения карбонильных групп, лежащего в сине-зеленой области спектра.

Измерение спектров хемилюминесценции при ПОЛ затруднено ввиду чрезвычайно малой интенсивности свечения. Использование монохроматоров в данном случае исключается. Единственно возможный путь учета спектрального состава — это применение светофильтров с резкими границами пропускания (могут быть обычные светофильтры, а еще лучше — интерференционные, с полушириной пропускания 8—15 нм и коэффициентом пропускания 30—50%). С помощью таких светофильтров был оценен спектральный состав хемилюминесценции, сопровождающей окисление олеиновой кислоты, и оказалось, что максимумы в спектрах (390, 460, 550 и 600 нм) также могут быть отнесены к карбонильным группам и возбужденным димерам кислорода (Иванов, Петрусевич, 1965, 1966). Позднее были изучены спектры свечения других ненасыщенных жирных кислот, некоторых масел и липидов, выделенных из органов животных (Иванов и др., 1972), причем результаты исследований свидетельствовали об изменении спектров по мере окисления субстрата, выражающееся в увеличении интенсивности свечения в длинноволновой области и уменьшении в коротковолновой, т. е. наблюдалось смещение спектров в красную область. Было предположено, что такое длинноволновое смещение спектра хемилюминесценции окисляющихся липидов связано с накоплением в системе в ходе окислительного процесса веществ-активаторов хемилюминесценции.

Флюоресцентный анализ липидов в процессе их автоокисления выявил целый ряд веществ, обладающих набором максимумов флюоресценции в области 360—550 нм, причем анализ фракций окисленных липидов показал, что более длинноволновая флюоресценция обязана своим происхождением продуктам более глубокого окисления (Черницкий, 1972; Орлов, 1975). О появлении флюоресцирующих продуктов при перекислении фосфолипидов, а также других липидов в присутствии веществ, содержащих аминогруппу, сообщает в своих работах А. Л. Таппель (Chio и др., 1969; Malshet и др., 1974). Эти продукты явля-

ются конъюгированными шиффовыми основаниями с общей структурной формулой $P_1 - N = CH - CH = CH - NH - P_2$ (где P — аминокислота или фосфолипид), которые в случае возбуждения при 355—390 нм флюоресцируют в сине-зеленой области спектра с максимальной $\lambda = 430 - 480$ нм.

Соответствие изменений спектров хемилюминесценции и флюоресценции в процессе окисления липидов позволяет предположить наличие некоторого общего механизма генерации квантов свечения. В работе С. Н. Орлова (1975) было проведено аналоговое моделирование сетки реакций ПОЛ, удовлетворительно коррелирующее с экспериментальными данными и позволяющее идентифицировать отдельные компоненты флюоресценции как результат определенных реакций ПОЛ, причем было показано соответствие изменений интенсивности некоторых компонентов флюоресценции и хемилюминесценции (например, УФ- и фиолетовая компоненты флюоресценции и синяя компонента хемилюминесценции). Участие флюоресцирующих продуктов в образовании квантов хемилюминесценции может происходить по механизму индукционно-резонансной миграции энергии с возбужденных продуктов реакций ПОЛ на флюоресцирующие продукты, которые, таким образом, оказываются активаторами хемилюминесценции. Вероятность подобной миграции описывается уравнением Фёрстера, экспериментально доказана на примере автоокисления системы этилбензол — антрацен и предполагается для случая хемилюминесценции липидов (Olenev, Vladimirov, 1973).

Мы подошли к наиболее сложному моменту в проблеме хемилюминесценции, из-за которого этот метод, заключающий в себе такие широкие возможности познания интимных процессов живой клетки, не используется в полной мере. Даже в чисто липидной системе при окислении образуется целый набор полностью не идентифицированных веществ, способных хемилюминесцировать. Интенсивность хемилюминесценции зависит от их количества и квантового выхода свечения каждого из этих веществ. В такой сложной системе, как биологическая мембрана, органелла или клетка, содержание большого количества веществ, способных люминесцировать и при наличии определенных условий быть активаторами «собственной» хемилюминесценции липидов объекта, не позволяет по интенсивности свечения судить бескомпромиссно о процессе, лежащем в его основе. Компромисс заключается в том, что обычно исследователи, пользующиеся хемилюминесцентным методом анализа, делают заключения не на основе абсолютных значений интенсивности свечения, а на основе значений динамики интенсивности в течение исследуемого процесса. Например, было обнаружено, что при консервировании биологических тканей, т. е. при условиях, обеспечивающих стабильность реакций, протекающих в них в течение достаточно длительного времени, интенсивность их хемилюминесценции находится на более или менее постоянном уровне, и изменение интенсивности служит сигналом о развитии в тканях процессов, препятствующих удачной трансплантации, т. е. о нарушениях функций и структуры биологического материала (Развадовский и др., 1972).

Следует также отметить, что колебания интенсивности спонтанной хемилюминесценции, имеющей чрезвычайно низкое значение, часто не позволяют исследователям получить достоверные, повторяющиеся результаты. Поэтому наиболее информативной является хемилюминесценция, индуцированная различными добавками. Более высокая ее интенсивность, с одной стороны, и знание химических реакций, протекающих в объекте при внесении определенной добавки, с другой, позволили значительно расширить наши представления о биохемилюминесценции (Владимиров, Арчаков, 1972; Сверхслабые свечения в

биологии, 1972; Сверхслабые свечения в медицине и сельском хозяйстве, 1974; Архангельская, 1978). Наиболее информативной в этом смысле можно считать хемилюминесценцию, индуцированную ионами двухвалентного железа Fe^{2+} .

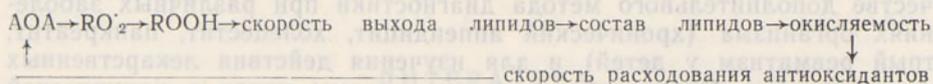
3. Как было уже отмечено выше, ионы Fe^{2+} играют очень важную роль в развитии кинетики процесса ПОЛ в биологических системах. Кроме того, добавки Fe^{2+} вызывают появление весьма характерной кинетической кривой свечения системы. Именно исследование этой кинетики, сопоставление ее с кинетикой образования продуктов ПОЛ в присутствии солей двухвалентного железа с учетом возможных реакций между ионами железа и свободными радикалами и гидроперекисями полностью подтвердили предположение о том, что хемилюминесценция обусловлена реакцией взаимодействия перекисных радикалов, ведущих цепи окисления липидов как в модельных, так и биологических системах. Более того, можно с уверенностью заявить, что измерение кинетики свечения в присутствии Fe^{2+} , в свою очередь, подтверждает правомерность применения к ПОЛ в мембранах теории цепных разветвленных реакций, объясняет роль двухвалентного железа в этих реакциях и является наиболее действенным и в то же время удобным методом изучения механизма ПОЛ в биологических мембранах.

Кинетическая кривая этого вида хемилюминесценции отличается большой сложностью. Ее можно условно разделить на несколько участков. При первом добавлении Fe^{2+} к суспензии биомембран, не содержащей гидроперекиси, кривая имеет латентный период, «медленную вспышку» свечения (автокаталитическое ускорение перекисного окисления и его спад) и стационарное свечение. При повторном добавлении Fe^{2+} (система уже содержит гидроперекиси) — «быструю вспышку» свечения, угнетение свечения, новую «медленную вспышку» и новый стационарный уровень. В этих стадиях свечения отражаются изменения концентрации свободных радикалов в системе, которые сопряжены с изменениями концентрации Fe^{2+} и $ROOH$. Кинетика ПОЛ и хемилюминесценции обусловлена двойной ролью ионов Fe^{2+} , которые, вступая в реакцию с гидроперекисями и разветвляя цепи окисления липидов, действуют как прооксиданты, а реагируя со свободными радикалами, выполняют функцию антиоксиданта. Соотношение между этими двумя реакциями определяется концентрацией железа. Например, на стадии латентного периода, когда концентрация железа выше критической, превалирует антиокислительное действие, однако в ходе постепенного окисления его концентрация становится ниже критической и начинает господствовать прооксидантное действие. Процесс ПОЛ развивается автокаталитически («медленная вспышка»); реакции с разветвлением цепей идут до тех пор, пока все железо не окислится и хемилюминесценция, достигнув максимального уровня «медленной вспышки», не начнет снижаться. На стадии «быстрой вспышки», т. е. при введении ионов Fe^{2+} в систему, содержащую гидроперекиси, итог реакции также зависит от концентрации железа, поскольку между расходом Fe^{2+} и изменением концентрации $ROOH$ существуют стехиометрические соотношения. Так, в соответствии с этими соотношениями при добавлении к суспензии митохондрий достаточно высоких концентраций Fe^{2+} (около 1 мМ) происходит «быстрая вспышка» хемилюминесценции, в конце которой почти вся предсуществующая гидроперекись разлагается, а концентрация Fe^{2+} понижается (Черемсина и др., 1971). При меньших концентрациях ионов железа в системе растрата их сопровождается накоплением гидроперекисей точно так же, как на начальной стадии «медленной вспышки». Если учесть, что при реакции разложения перекисей образуются свободные радикалы, с которыми

могут реагировать ионы Fe^{2+} , то становится понятным, что все описанные выше изменения в содержании Fe^{2+} и $ROOH$ должны отражаться на содержании свободных радикалов, а значит, и на интенсивности свечения, пропорциональной квадрату концентрации радикалов.

Информативность кинетических кривых хемилюминесценции

Как видно, сложная кинетика хемилюминесценции, индуцированной ионами двухвалентного железа, при понимании ее связи с сущностью протекающих реакций, становится источником значительной информации об окислительных процессах в объекте, а как мы уже сказали, именно процессы ПОЛ резко интенсифицируются при многих патологиях. В то же время, поскольку мембрана является кооперативной системой, то даже самые малые отклонения в геометрии основных компонентов мембран — белков и липидов — и во взаимосвязи между ними могут служить источником перестройки структуры мембраны в целом и изменений клеточного метаболизма по многим показателям. Например, в облученных мембранах, в которых резко интенсифицируются окислительные реакции в липидах, вместе с этим появляются новые фракции липидов, несвойственные клеточным органеллам здоровых животных, изменяются относительный состав липидов мембран и их структурная вязкость. Изменение состава липидов приводит к изменению липид-белковых взаимодействий в мембране, условий структурных переходов в ней, активности мембраносвязанных ферментов. Состав липидов влияет также на устойчивость ферментов к повреждению, чувствительность белковых рецепторов к определенным сигнальным веществам, на соотношение растворимой и связанной форм фермента. Поэтому одновременное взаимосвязанное изменение состава липидов мембран при изменении скорости окислительных превращений в них вызывает переход клетки в новое метаболическое состояние (Бурлакова, 1979). По Е. Б. Бурлаковой, в этом заключается регуляторная роль окислительных свободно-радикальных реакций в липидах, взаимосвязанных с другими регуляторными системами клетки. Регуляция самих окислительных процессов, их стационарность в норме, а также на ранних этапах патологии, осуществляются по следующей схеме:



где AOA — антиокислительная активность липидов (Бурлакова, 1976). Из сказанного выясняется, какое важное место в системе регуляции окислительных процессов в липидах отведено такому их физико-химическому свойству как антиокислительная активность. Более того, показано, что изучение AOA позволяет охарактеризовать изменения в системе клеточных липидов в целом, обнаружить закономерности, характерные для интактного организма, при действии на него повреждающих агентов, а также при развитии заболеваний (Бурлакова и др., 1975).

В последние годы для оценки AOA все чаще используются точные и оперативные методы хемилюминесценции, часть которых основана на собственном свечении липидов и их фракций, а часть — на свечении хемилюминесцентных моделей, с помощью которых изучается активность липидов или иных веществ биологического происхождения (подробное описание методов дано в монографии Е. Б. Бурлаковой и др. (1975)). Однако активность антиоксидантов можно определить и по све-

чению мембранных систем в присутствии ионов Fe^{2+} . Подчеркивая большое информационное значение кинетических кривых данного типа хемилюминесценции, назовем те характеристики излучающей системы, которые можно измерить с помощью описанного метода.

Количество свободных радикалов и их динамика в ходе окислительных реакций.

АОА липидов в системе, оказывающая влияние на скорость нарастания интенсивности хемилюминесценции на стадии «медленной вспышки», т. е. угол наклона на стадии роста интенсивности. Эти две величины связаны соотношением $\delta/\delta_0 - 1 = A[\ln H]$, где δ — тангенс угла наклона в отсутствие (δ_0) и присутствии (δ) антиоксиданта, A — постоянная, характеризующая активность антиоксиданта (Гукасов, Федоров, 1977). АОА можно определить и по длительности латентного периода, так как антиоксидант, вступивший в реакцию со свободными радикалами, служит конкурентом для ионов железа, в результате чего снижение концентрации последнего до критической отдалится во времени (Владимиров и др., 1974). Более того, тщательное изучение действия разных антиоксидантов на кинетику индуцированной ионами Fe^{2+} хемилюминесценции биомембран выявило возможность получения информации о механизме антиокислительного действия изучаемых соединений. Эта информация заложена во всей совокупности изменений кинетики хемилюминесценции системы при введении в нее антиоксидантов. Измеряемые параметры — это длительность латентного периода, скорость развития «медленной вспышки», амплитуда «быстрой вспышки» и «промежуточной вспышки», в некоторых случаях наблюдаемой при развитии ПОЛ биомембран. Вероятно, ее появление связано с барьерной функцией мембран, увеличением их проницаемости на самых ранних стадиях ПОЛ (Гукасов, Федоров, 1977). Содержание гидроперекисей в системе, определяемое с помощью солей двухвалентного железа, которые вводятся в избыточной концентрации, причем избыток должен быть такой, чтобы за время «быстрой вспышки» эта концентрация уменьшалась не более, чем на 10—20%. В таком случае амплитуда «быстрой вспышки» будет пропорциональна содержанию гидроперекисей в системе до введения Fe^{2+} (Владимиров и др., 1974).

Измерение кинетики свечения в присутствии ионов Fe^{2+} таких систем организма, как плазма крови и моча, используется в клинике в качестве дополнительного метода диагностики при различных заболеваниях организма (хронический аппендицит, холецистит, панкреатит, острый ревматизм у детей) и для изучения действия лекарственных препаратов (см. Сверхслабое свечение плазмы крови в клинической диагностике, 1974). Оказалось, что более информативным с точки зрения диагностики является такой параметр, как светосумма свечения, т. е. площадь поверхности под кинетической кривой в относительных единицах. Следует добавить, что в качестве диагностического теста при ряде заболеваний (различные типы воспалений, в частности при туберкулезе, рост злокачественных новообразований, хронические заболевания — склероз, астма, гипотония) применяется и спонтанное свечение плазмы крови (Журавлев, Журавлева, 1975). Исследования показали, что, несмотря на большой разброс значений интенсивности свечения плазмы крови здоровых людей, при некоторых заболеваниях обнаруживаются достоверные сдвиги интенсивности и нормализация после лечения (советскими учеными получено несколько патентов по применению метода измерения спонтанной хемилюминесценции плазмы крови в комплексной диагностике некоторых заболеваний).

При исследовании индуцированной ионами Fe^{2+} хемилюминесценции биологических систем следует иметь в виду определенные методи-

ческие сложности. Во-первых, длительность «быстрой вспышки» мала (несколько секунд), а время нарастания вспышки может не превышать секунды, и постоянная времени регистрирующей аппаратуры может оказаться большей. В таком случае значение амплитуды вспышки получится заниженным в силу инерционности аппаратуры. Для исключения такой возможности вместо обычного усилителя постоянного тока и самописца следует использовать малоинерционный усилитель в сочетании с осциллографом. Во-вторых, время перемешивания растворов после введения солей железа сравнительно велико (обычно порядка 0,3—0,5 сек), при высокой концентрации Fe^{2+} соизмеримо со временем нарастания «быстрой вспышки».

Однако, несмотря на эти сложности, хемилумinesцентный метод анализа окислительных процессов в липидах имеет значительные преимущества перед другими методами. 1. Он дает возможность миновать экстракцию липидов, изучать процесс ПОЛ, не нарушая целостности биологического материала, что особенно важно, поскольку развитие процесса ПОЛ в мембранах взаимосвязано с их структурным состоянием. 2. Кинетическая кривая индуцированного Fe^{2+} свечения одной пробы несет в себе информацию, равную информации, которую можно получить лишь при использовании нескольких более трудоемких методов. Например, для определения содержания продуктов ПОЛ применяются такие методы, как амперометрическое титрование, УФ-спектрофотометрия, полярография и флюоресценция в видимой области спектра. Причем для определения содержания гидроперекисей в системе этими методами необходима экстракция липидов. 3. Поскольку интенсивность хемилумinesценции пропорциональна квадрату концентрации перекисных радикалов, анализ ее кинетики дает информацию о наличии радикалов RO_2^{\cdot} в системе. Чувствительность хемилумinesцентного метода по сравнению с другими методами обнаружения свободных радикалов (например, метод электронного парамагнитного резонанса — ЭПР) в случае высокоактивных короткоживущих радикалов типа перекисных очень высока. При высокой скорости взаимодействия радикалы вообще могут не быть обнаружены методом ЭПР, тогда как хемилумinesценция в такой системе с уверенностью регистрируется. Надо только иметь в виду, что с помощью хемилумinesцентного метода можно получить не абсолютные, а относительные значения содержания в исследуемом объекте продуктов перекисного окисления липидов.

ЛИТЕРАТУРА

- Агавердиев А. Ш., Тарусов Б. Н. Сверхслабая хемилумinesценция стеблей пшеницы в зависимости от температуры. — Биофизика, 1965, 10, 351—353.
- Александров И. Р., Дунаевская Н. В., Иванов О. И., Карнаух И. М., Остапенко А. А., Пельтек С. М., Стучинский Г. Б. Некоторые характеристики ФЭУ с первым диодом из фосфида галлия в хемилумinesцентных счетчиках. — Приборы и техника эксперимента, 1977, 2, 176—178.
- Архангельская Н. В. Изучение механизма индуцированной формальдегидом хемилумinesценции биомембран. — Канд. дис., М., 1978.
- Арчаков А. И. Микросомальное окисление. — М., 1975.
- Бурлакова Е. Б. Свободнорадикальный механизм регуляции клеточного метаболизма и его связь с другими регуляторными системами. — Мат. симп. «Свободнорадикальное окисление липидов в норме и патологии». М., 1976, 18—19.
- Бурлакова Е. Б. Действие ионизирующей радиации на регуляторную функцию биомембран. — Научный совет АН СССР по проблемам радиобиологии. Информ. бюл., 1979, 22, 3—6.
- Бурлакова Е. Б., Алесенко А. В., Молочкина Е. М. и др. Биоантиоксиданты в лучевом поражении и злокачественном росте, М., 1975.
- Васильев Р. Ф., Вичутинский А. А. О природе связи хемилумinesцен-

- ции и окисления молекулярным кислородом. — Докл. АН СССР, 1962, 142, 615—619.
- Васильев Р. Ф., Русина И. Ф. Механизм хемилюминесценции при окислении органических веществ в растворе. — Докл. АН СССР, 1964а, 156, 1402—1408.
- Васильев Р. Ф., Русина И. Ф. О хемилюминесценции молекулярного кислорода при окислении органических веществ. — Изв. АН СССР, серия хим., 1964б, 9, 1728—1731.
- Владимиров Ю. А., Оленев В. И., Сулова Т. Б. Информация анализа кривых хемилюминесценции при перекисном окислении липидов. — В кн.: Сверхслабое свечение плазмы крови в клинической диагностике. М., 1974, 6—34.
- Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М., 1972.
- Гукасов В. М., Федоров В. К. Влияние гормонов на процесс перекисного окисления липидов биологических мембран. — В кн.: Роль изменений структуры мембран в клеточной патологии. М., 1977, 8—52.
- Гурвич А. Г., Гурвич Л. Д. Митогенетическое излучение. Л., 1934.
- Журавлев А. И. Субстраты и механизмы эндогенной (химической) генерации возбужденных электронных состояний и сверхслабого свечения в тканях. — В кн.: Сверхслабые свечения в биологии. Тр. МОИП, 1972, 39, 17—32.
- Журавлев А. И., Журавлева А. И. Сверхслабое свечение сыворотки крови и его значение в комплексной диагностике. М., 1975.
- Журавлев А. И., Филиппов Ю. Н., Симонов В. В. К механизму хемилюминесценции липидов. — Биофизика, 1965, 10, 246—250.
- Иванов И. И., Бузас С. К., Гольдштейн Н. И. Механизмы хемилюминесценции при окислении жирных кислот и жиров. — В кн.: Сверхслабые свечения в биологии. Тр. МОИП, 1972, 39, 52—59.
- Иванов И. И., Петрусевич Ю. М. Регистрация спектров хемилюминесценции ненасыщенных жирных кислот и некоторых биоллипидов. — Научн. докл. высш. шк., биол. науки, 1965, 3, 81—84.
- Иванов И. И., Петрусевич Ю. М. Исследование спектров хемилюминесценции ненасыщенных жирных кислот и некоторых биоллипидов. — В кн.: Свободнорадикальные процессы в биологических системах. Тр. МОИП, 1966, 16, 13—15.
- Мазо В. К., Ситковский М. В., Яньюшин М. Ф., Данилов В. С., Ямпольская Г. П., Измайлова В. Н., Козлов Ю. П. Изучение взаимодействия белков с окисленными жирными кислотами. — В кн.: Биоантиокислители. Тр. МОИП, 1975, 52, 212—216.
- Мазур П. С., Ратманский А. Ю. Некоторые перспективы автоматизированной обработки хемилюминесцентной информации. — В кн.: Хемилюминесцентный метод в биологии и медицине. Киев, 1978, 17—18.
- Мерзляк М. Н., Соболев А. С. Роль супероксидных анион-радикалов и синглетного кислорода в патологии мембран. — Итоги науки и техники. Биофизика, 1975, 5, 118—165.
- Орлов С. Н. Исследование свободнорадикального окисления высших жирных кислот и фосфолипидов биологических мембран. — Канд. дис. М., 1975.
- Развадовский В. Д., Есакова Т. Д., Парфентьева В. Ф. Применение метода хемилюминесценции для оценки биологической активности консервированного костного трансплантата. — Тез. докл. IV Междунар. биофиз. конгр., 1972, 4, 353.
- Сверхслабое свечение плазмы крови в клинической диагностике. М., 1974.
- Сверхслабые свечения в биологии. М., 1972.
- Сверхслабые свечения в медицине и сельском хозяйстве. М., 1974.
- Сидорик Е. П., Данко М. И., Мизернюк А. Т., Баглей Е. А., Гордиенко Е. В. Разработка отечественного промышленного хемилюминометра и возможности автоматизации хемилюминесцентных исследований. — В кн.: Хемилюминесцентный метод в биологии и медицине. Киев, 1978, 11—12.
- Тарусов Б. Н., Поливода А. И., Журавлев А. И. Обнаружение хемилюминесценции в печени облученных животных. — Радиобиология, 1961а, 1, 150—151.
- Тарусов Б. Н., Поливода А. И., Журавлев А. И. Обнаружение сверхслабой спонтанной хемилюминесценции животных клеток. — Биофизика, 1961б, 6, 490—492.
- Тарусов Б. Н., Поливода А. И., Журавлев А. И., Секамова Е. Н. Сверхслабое спонтанное свечение животных тканей. — Цитология, 1962, 4, 696—699.
- Тарусов Б. Н., Журавлев А. И. Биохемилюминесценция липидов. — В кн.: Биохемилюминесценция. Тр. МОИП, 1965, 21, 125—132.
- Тарусов Б. Н., Иванов И. И., Петрусевич Ю. М. Сверхслабое свечение биологических систем. М., 1967.

- Черницкий Е. А. Люминесценция и структурная лабильность белков в растворе и клетке. Минск, 1972.
- Шляпникох В. Я., Карпухин О. Н., Постников Л. М., Захаров И. В., Вичутинский А. А., Цепалов В. Ф. Хемилюминесцентные методы исследования медленных химических процессов. М., 1966.
- Barber, A. A., Wilbur, K. M. Inhibition of cell division by ultravioletirradiated unsaturated fatty acid. — *Exptl. Cell Res.*, 1957, **13**, 503—509.
- Bogdanski, C. Informative aspects of the ultraweak bioluminescence. — In: 6th Int. Congr. Photobiol. Bochum, 1972. Bochum, 1972, 78.
- Chio, K. S., Reiss, U., Fletcher, B., Tappel, A. L. Peroxidation of subcellular organelles: formation of lipofuscinlike fluorescent pigments. — *Science*, 1969, **166**, 1535—1536.
- Christophersen, B. O. Reduction of linolenic acid hydroperoxide by a glutathione peroxidase. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1968, **176**, 463—470.
- Colli, L., Facchini, U., Rossi, A. Study of RCA 5819 and EMI 62-60 Photoamplifier as individual photon counter. — *Nuovo cimento*, 1954, **11**, 255—256.
- Dillard, C. J., Tappel, A. L. Fluorescent products from reaction of peroxidizing polyunsaturated fatty acids with phosphatidyl ethanolamine and phenylalanine. — *Lipids*, 1973, **8**, 183—189.
- Hochstein, P., Ernster, L. ADP-activated lipid peroxydation coupled to the TPN-H oxidase system of microsomes. — *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1963, **12**, 388—394.
- Lepeschkin, W. Über nekrobiotische Strahlungen. — *Protoplasma*, 1934, **21**, 594—595.
- Lloyd, D., Boveris, A., Reiter, R., Filipkowski, M., Chance, B. Chemiluminescence of *Acanthamoeba castellanii*. — *Biochem. J.*, 1979, **184**, 149—156.
- Malshet, V. G., Tappel, A. L., Burns, V. M. Fluorescent products of lipid peroxidation. II. Methods for analysis and characterization. — *Lipids*, 1974, **9**, 328—332.
- Olenev, V. I., Vladimirov, Ju. A. The chemiluminescence accompanying the lipid peroxidation in biological membranes. XI. The chemiluminescence spectra. — *Stud. Biophys.*, 1973, **38**, 131—138.
- Russel, C., Cormier Milton, J. Recent advances in mechanisms of bio- and chemiluminescent reactions. — *Photochem. Photobiol.* 1979, **29**, 344—351.
- Stauff, J., Schmidkunz, H., Hartmann, G. Weak chemiluminescence of oxidation reactions. — *Nature*, 1963, **198**, 281—284.
- Takanaka, K., O'Brien, P. J. Generation of activated oxygen species by polymorphonuclear leucocytes. — *FEBS Lett.*, 1980, **110**, 283—286.
- Vassil'ev, R. F. Chemiluminescence in liquid-phase reactions. — In: *Progress in Reaction Kinetics*, v. 4, 1967, Oxford — N. Y., 305—312.
- Wills, E. D. Effect of lipid peroxidation on membrane-bound enzymes of endoplasmic reticulum. — *Biochem. J.*, 1971, **123**, 983—991.
- Wright, J. R., Rumbaugh, R. C., Colby, H. D., Miles, P. R. The relationship between chemiluminescence and lipid peroxidation in rat hepatic microsomes. — *Arch. Biochem. Biophys.*, 1979, **192**, 344—351.

Институт экспериментальной биологии
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию
6/VII 1981

Natalja ARHANGELSKAJA

BIOLOOGILISTE JA MUDELSÜSTEEMIDE ÜLINÖRK KEMOLUMINESTSENTS

Bioloogiliste objektide universaalne omadus on ülinõrga kemoluminestsentsi genereerimine spektri nähtavas osas. Nimetatud helendus tekib lipiidides kulgevate peroksidatiivsete reaktsioonide käigus, kusjuures kvantide emissiooniks vajalik energia vabaneb peroksiidide radikaalide rekombineerumisel. Kuigi kemoluminestsentsi algpõhjus on lipiidide peroksidatsioon (LP), oleneb tema intensiivsus lõppkokkuvõttes ka teistest uuritavas süsteemis sisalduvatest komponentidest. Sellega seoses pole võimalik kemoluminestsentsi hetkväärtuse abil otsustada LP-produktide sisalduse üle. Helenduse kineetika (eelkõige Fe²⁺ keskkonnas) uurimismeetodite läbitöötamine võimaldab abstraheeruda kõrvalistest kemoluminestsentsi parameetrid mõjutavatest faktoritest ning jälgida vahetult LP-reaktsioonide kulgemist. Kemoluminestsents on leidnud laialdast rakendamist mitte ainult bioloogias, vaid ka meditsiinis (sel meetodil diagnoositakse ja ravitakse haigusi, millega kaasneb LP intensiivistumine).

