

# ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ



**Люминесценция (англ. *luminescence*) –**  
**- свечение.**

**Термин введен Видеманом в 1889 году.**



**Сергей Иванович  
Вавилов  
1891-1951**

**Выдающуюся роль в развитии учения о люминесценции сыграла советская школа физиков, созданная **С.И. Вавиловым** (президент АН СССР 1945 – 1951).**

**Вавилов и его ученики изучали этот вопрос с начала 20-х годов прошлого века, практически до конца жизни Сергея Ивановича.**

**Был решен ряд принципиальных вопросов о природе этого явления и применения люминесценции в науке и практике.**

# Типы люминесценции

## ФОТОЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ

свечение под влиянием  
света (УФ- и видимого)

### Флуоресценция

$\tau = 10^{-9} - 10^{-6} \text{ с}$

### Фосфоресценция

$\tau = 10^{-3} - 10^{-1} \text{ с}$

## ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ

свечение, использует  
энергию хим. реакций

## БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ

способность живых организмов  
светиться, достигаемая само-  
стоятельно или с помощью  
симбионтов.

# Другие типы люминесценции

**РАДИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ** - при возбуждении вещества ионизирующим излучением.

**ЭЛЕКТРОЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ** - возникает при пропускании электрического тока через определённые типы люминофоров.

**ТЕРМОЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ** - свечение, возникающее в процессе нагревания вещества.  
Синоним: **Термостимулированная люминесценция.**

**КАТОДОЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ** - вызвана облучением быстрыми электронами (катодными лучами).

# ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ

Многие химические реакции протекают с выделением энергии в форме тепла (экзотермические реакции).

Существуют химические реакции, протекающие с излучением света.

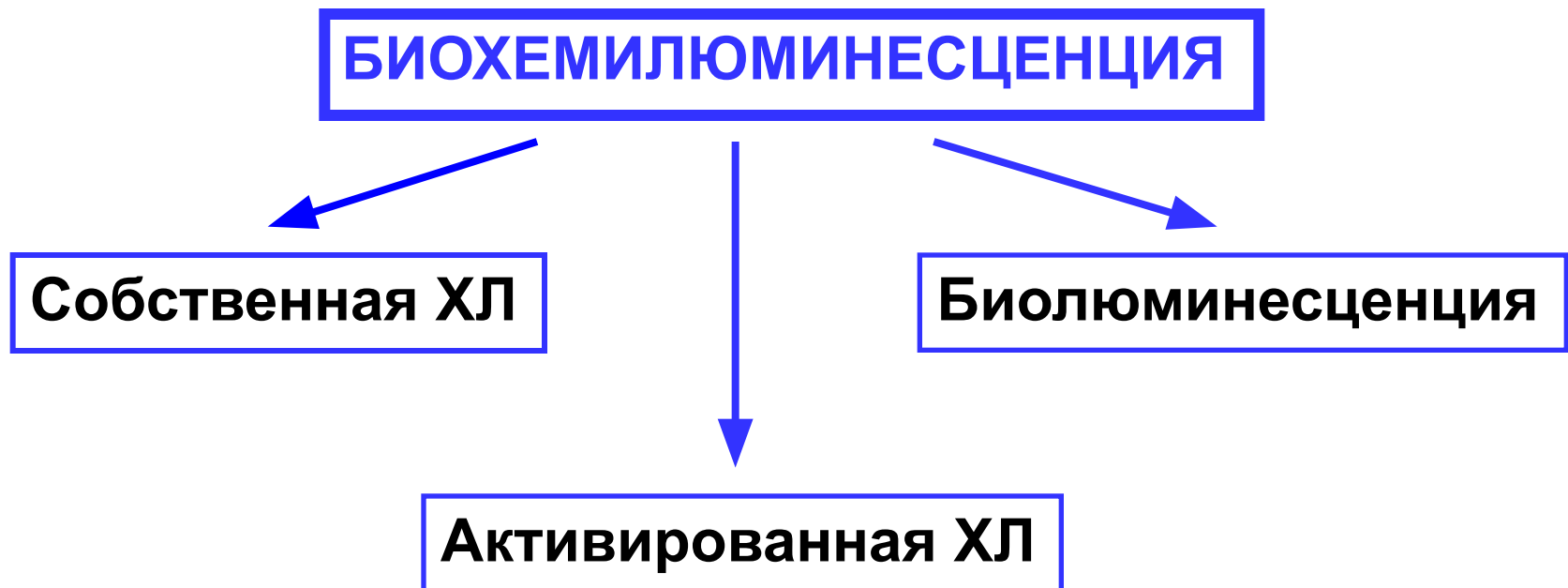
**Хемилюминесценция (ХЛ)** - свечение, сопровождающее химические реакции.

Большинство биохимических реакций сопровождаются сверхслабым свечением («сверхслабое свечение» или «собственное излучение» клеток и тканей).

# ХЛ в биосистемах - **биохемилюминесценция**

Некоторые организмы излучают сравнительно яркий свет, хорошо видимый невооруженным глазом - **биолюминесценция**

## Классификация ХЛ в биосистемах

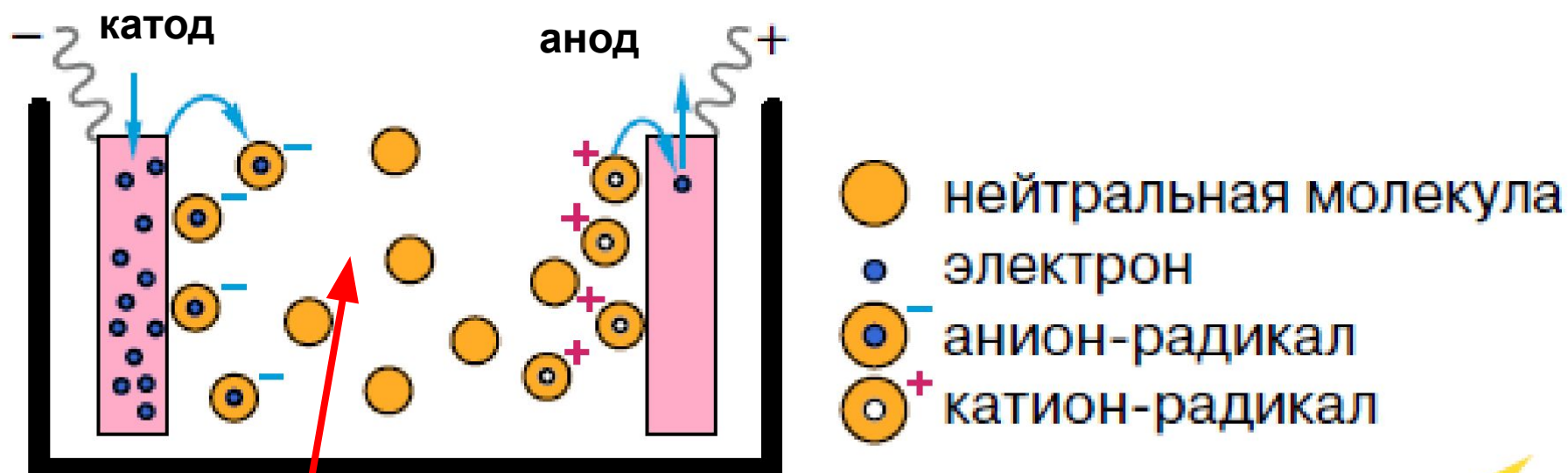


В основе био-ХЛ (собственного или сверхслабого свечения) лежат **реакции взаимодействия между свободными радикалами (СР)**: радикалами липидов, радикалами кислорода и радикалами оксида азота.

**А.Г.Гурвич (1934 г.)** первым обнаружил собственное свечение клеток - «митогенетические лучи».



# Механизм превращения энергии хим. реакции в световое излучение на примере рекомбинации органических радикалов, получаемых с помощью электрохимической реакции (по Ю.А. Владимирову)

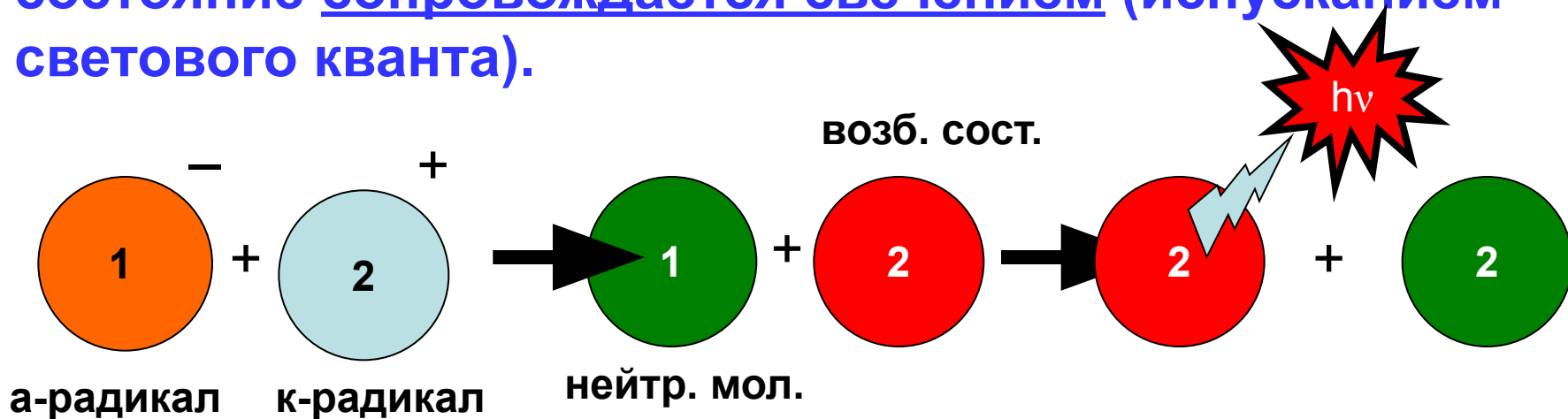


Раствор полициклических углеводородов (пирен, антрацен и др.), способных к люминесценции

**Электролиз** – способ получения анион-радикалов и катион-радикалов молекул углеводорода (**запасание энергии в системе**)

**Образование радикалов:** с катода на нейтральную молекулу переходят электроны, образуя анион-радикал ( $q^-$ ); на аноде нейтральная молекула отдаёт электрон, образуя катион-радикал ( $q^+$ ).

Образовавшиеся в системе **ион-радикалы взаимодействуют**, при этом образуется две исходных молекулы углеводорода, **но одна из этих молекул оказывается в электронно-возбужденном состоянии**. Её возврат из возбужденного состояния в основное состояние **сопровождается свечением** (испусканием светового кванта).



**Собственная (слабая) ХЛ  
клеток и тканей**

```
graph TD; A[Собственная (слабая) ХЛ клеток и тканей] --> B[Реакции с участием АФК]; A --> C[Реакции СРО липидов]; A --> D[Реакции NO];
```

**Реакции с участием  
АФК**

**Реакции NO**

**Реакции СРО липидов**

## I тип реакций:

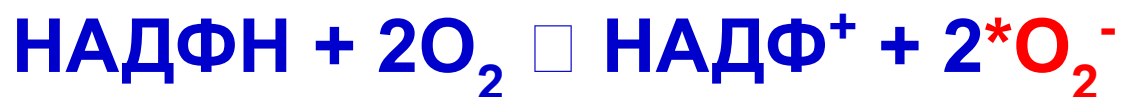
### Собственное свечение клеток и тканей с участием активных форм кислорода

#### Активные формы кислорода (АФК):

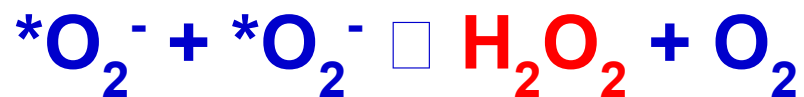
- перекись водорода ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )
- супероксидный анион-радикал кислорода ( $^*\text{O}_2^-$ )
- радикал гидроксила ( $\text{HO}^*$ )
- гипохлорит ( $\text{ClO}^-$ )

Значимыми источниками АФК в организме – **клетки-макрофаги** (гранулоциты и моноциты крови, а также тканевые макрофаги). АФК, выделяемые активированными макрофагами внутрь фагоцитозной везикулы, служат цитотоксическими факторами, убивающими патогенные микроорганизмы.

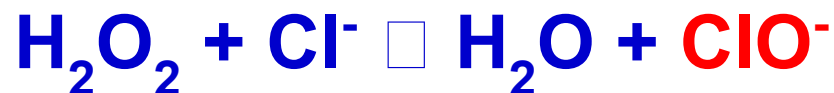
В мембранах макрофагов содержится НАДФН-оксидазный комплекс, с помощью которого НАДФН окисляется в результате восстановления двух молекул кислорода до  $*\text{O}_2^-$ :



Супероксидные радикалы кислорода рекомбинируют между собой с образованием  $\text{H}_2\text{O}_2$ :



Макрофаги выделяют наружу миелопероксидазу, которая катализирует образование **гипохлорита**:



В присутствии ионов железа (металл с переменной валентностью) образуется **HO\***:

- из  $H_2O_2$  в реакции Фентона:



- из гипохлорита в реакции Осипова:



Собственное свечение активированных фагоцитов было открыто в 1971 году Р. Элланом.

Полагают, что свечение обусловлено образованием **синглетного кислорода** ( $^1\text{O}_2$  – одна из форм возбужденного состояния кислорода) в реакции:



Далее, синглетный кислород **переходит в основное (триплетное) состояние** с испусканием **кванта света в ИК-области**:

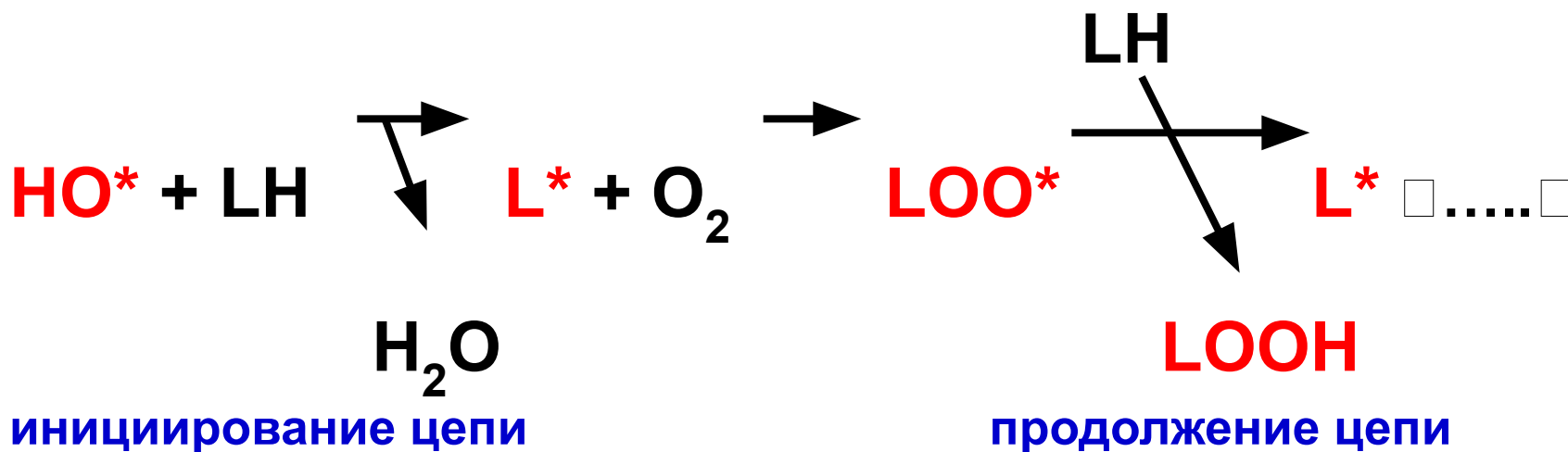


Синглетный кислород способен также образовывать **димеры (эксимеры)**, которые переходят в основное состояние **с испусканием квантов с  $\lambda = 635, 580$  и  $535$  нм** (видимая область спектра).

## II тип реакций:

Собственное свечение клеток и тканей с участием цепного свободнорадикального/перекисного окисления липидов (СРО липидов, ПОЛ)

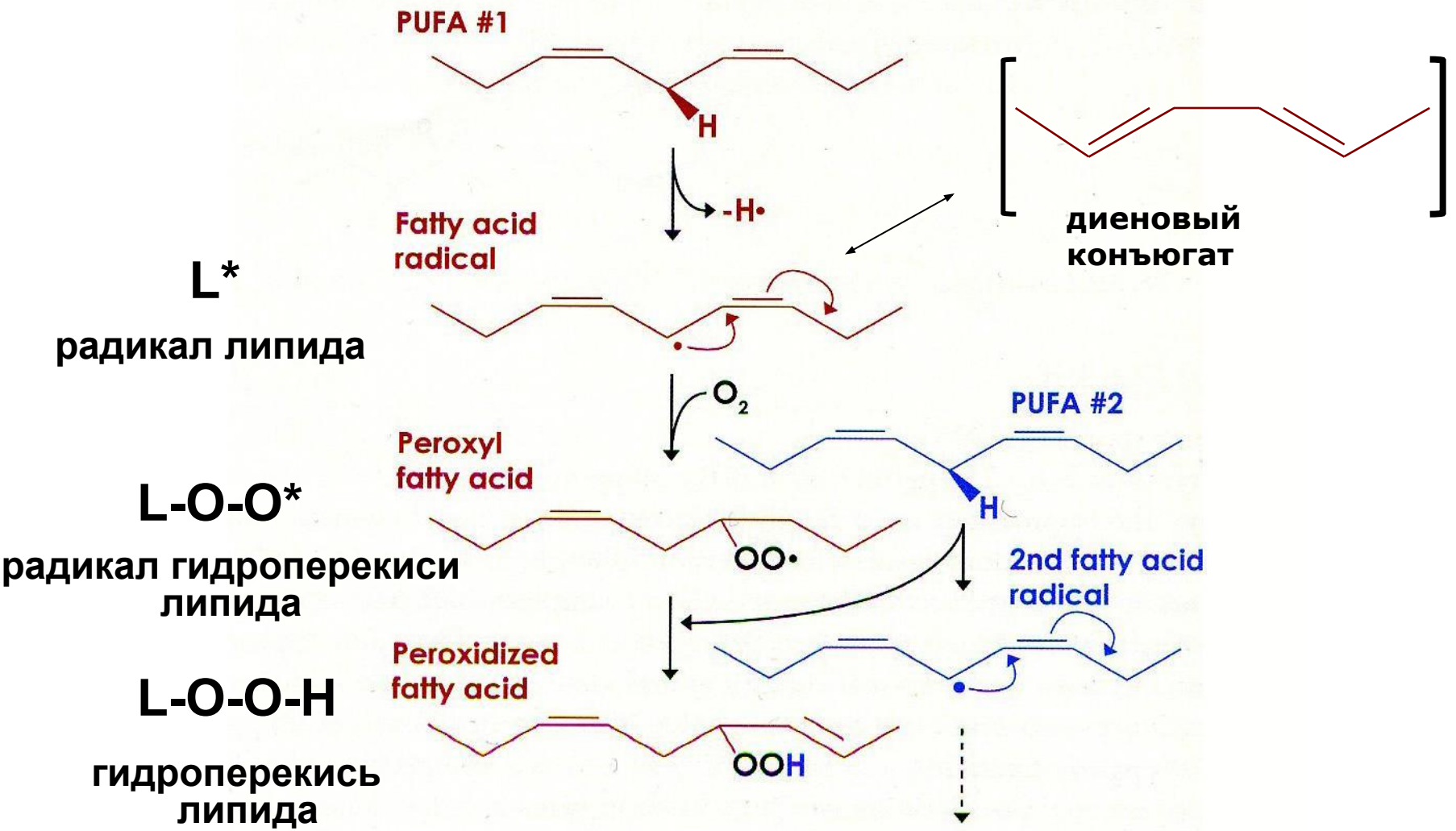
СРО липидов постоянно (с разной интенсивностью) протекает в биомембранах и ЛП крови. Эти реакции идут с участием СР липидов ( $L^*$ ) и СР гидроперекисей липидов ( $LOO^*$ ):



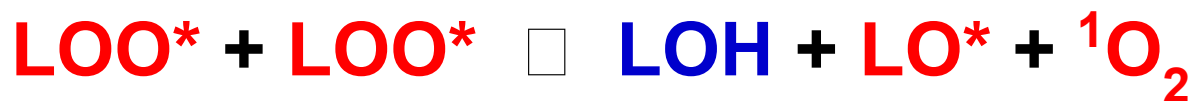


# Образование гидроперекиси ПНЖК и её радикала

PUFA – PolyUnsaturated Fatty Acid = ПНЖК



LOO\* - СР, которые ведут цепь СРО липида. Их взаимодействие приводит к образованию продуктов, которые находятся в электронно-возбужденном состоянии:



Их переход ( $\text{LO}^*$  и  ${}^1\text{O}_2$ ) в основное состояние сопровождается испусканием света:



Вещества, взаимодействующие со СР и уничтожающие их – **АНТИОКСИДАНТЫ (АО)**. **АО подавляют свечение, обусловленное реакциями СРО.**

### III тип реакций:

**Собственное свечение клеток и тканей с участием оксида азота (NO)**

Оксид азота – CP (\*NO). Синтезируется с участием фермента *NO-синтазы* из L-аргинина. NO выполняет функцию вазодилататора.

В клетках возможна также реакция:



Роль этой реакции в собственном свечении клеток и тканей показана в 1984 году Терренсом.

**Свечение происходит при взаимодействии пероксинитрита с белками.**

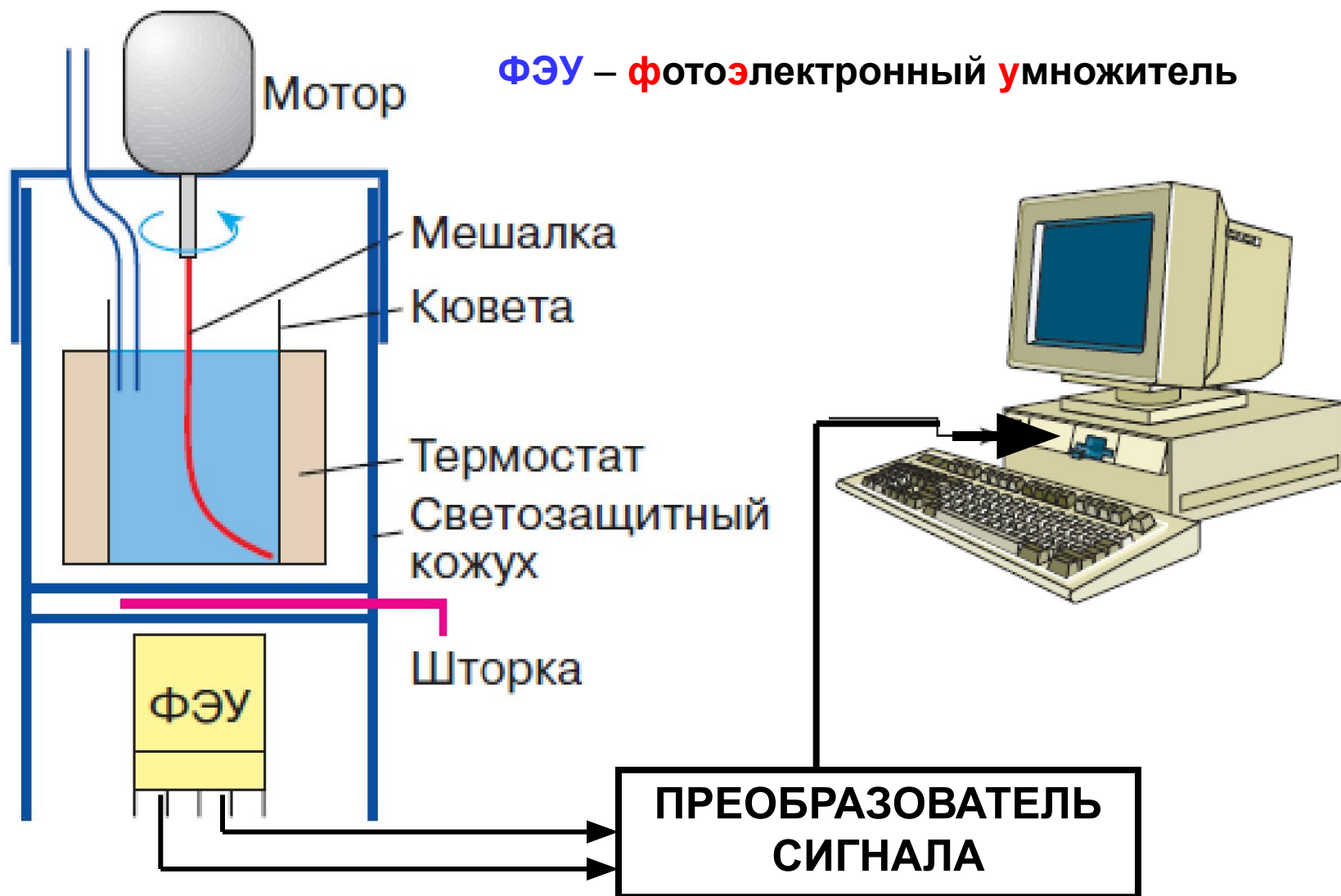
## **Причины чрезвычайно низкой интенсивности собственной ХЛ клеток и тканей («сверхслабое свечение»)**

**1. [СР] в биологических системах сравнительно мала, поскольку СР – высокореактивные соединения. В результате - невысоки скорости тех реакций, в ходе которых происходит свечение.**

**2. Не в 100% случаев взаимодействия СР образуются электронно-возбужденные молекулы продуктов реакции.**

**3. Нет 100% вероятности того, что электронно-возбужденная молекула отдаст избыток энергии в форме светового кванта. Эта энергия может просто рассеяться в форме тепла.**

Прибор, с помощью которого регистрируют **собственную ХЛ** клеток и тканей – **ХЕМИЛЮМИНОМЕТР**.



# Что измеряем с помощью хемилюминометра?

Главные участники реакций, лежащих в основе ХЛ клеток и тканей – **СР**. Их концентрация в биоматериале чрезвычайно низка, а время жизни – доли секунды (как результат высокой химической активности). Это исключает применение методов химического анализа для определения [СР].

Измерение **интенсивности ХЛ** ( $J_{\text{хл}}$ ) с помощью хемилюминометра – позволяет хоть и косвенно (мы не считаем количество СР), но с высокой точностью судить об активности реакций с участием СР в биоматериале. Между  $J_{\text{хл}}$  и [СР] существует прямая зависимость.

Интенсивность ХЛ при СРО липидов равна скорости образования фотонов (квантов светового излучения) в реакции:



По закону действующих масс, скорость реакции (моль продукта / сек) можно представить как:

$$V = k [\text{LOO}^*]^2 \quad \text{где } k \text{ – константа скорости}$$

Тогда, интенсивность ХЛ ( $J_{\text{ХЛ}}$ , фотоны / сек) можно выразить:

$$J_{\text{ХЛ}} = Q_{\text{ХЛ}} \times k \times [\text{LOO}^*]$$

где  $Q_{\text{ХЛ}}$  – квантовый выход ХЛ;  $Q_{\text{ХЛ}} = \frac{\text{к-во квантов (фотонов)}}{\text{к-во возбужд. молекул}}$

Т.о., **интенсивность свечения (интенсивность ХЛ)** отражает **[СР]**, которые ведут (продолжают) цепи реакций ПОЛ, в каждый момент времени. Это даёт ценную информацию для анализа механизмов реакций на основе измерения кинетики ХЛ.



# Применение собственной (неактивированной) ХЛ

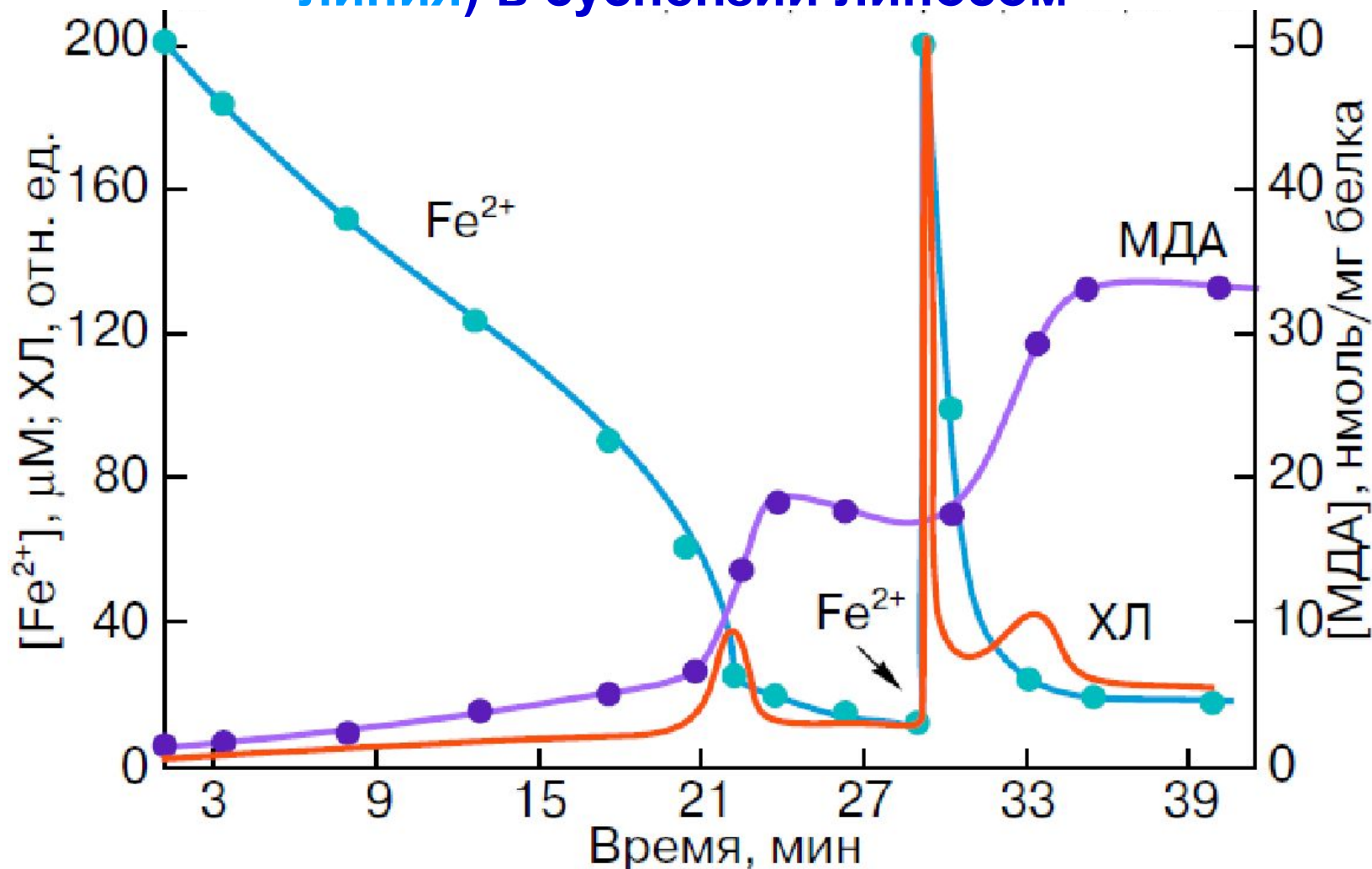
1. Изучение фундаментальных механизмов протекания реакций ПОЛ в живых системах, их регуляции и механизмов действия АО различной природы (**антиперекисные АО** – разрушают уже образовавшиеся органические гидроперекиси и **антирадикальные АО** или «ловушки» **СР** – уничтожают СР).

**2. Показатель активности процессов СРО липидов в тканях организма (сыворотка, плазма и клетки крови) **при патологии** .**

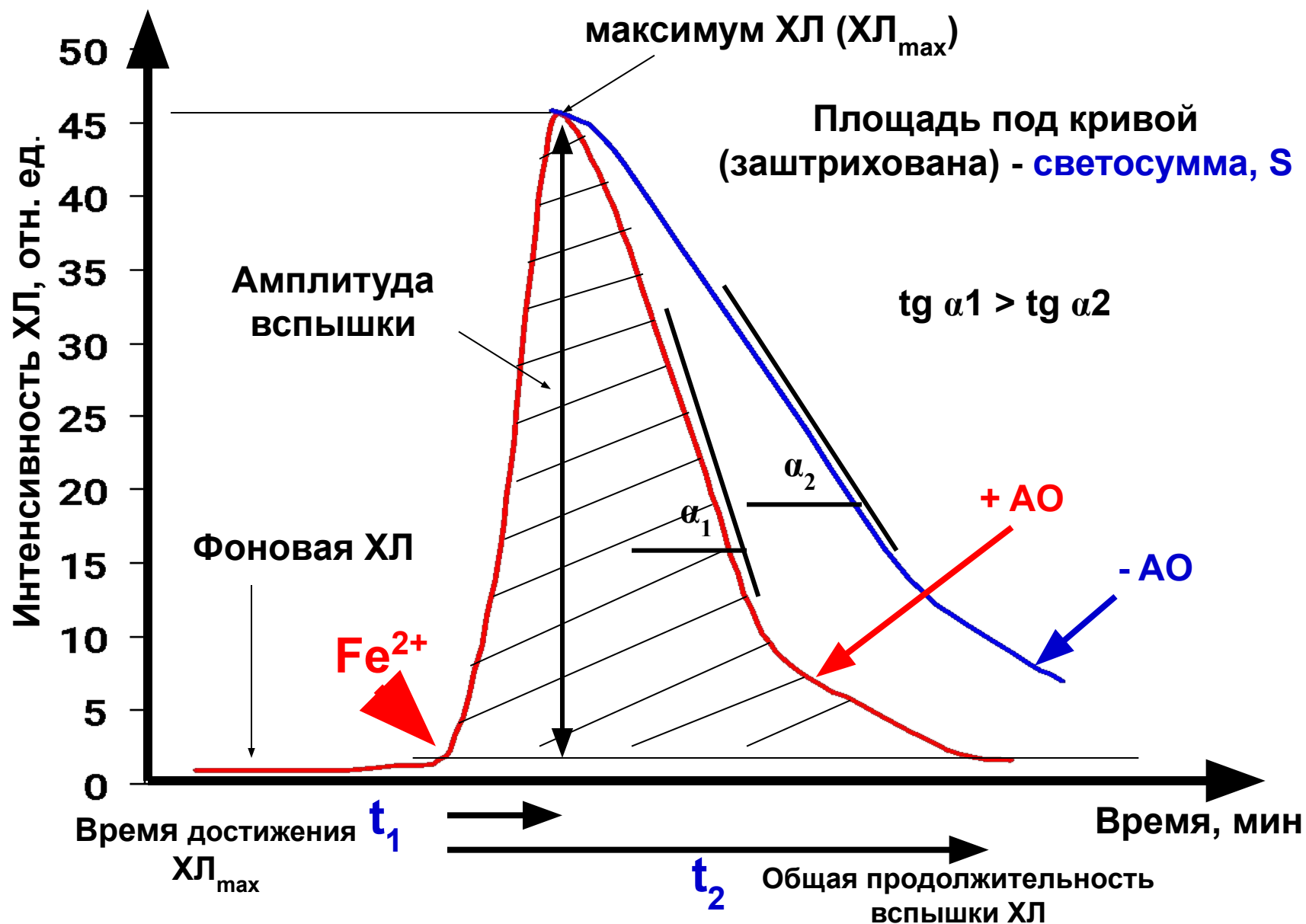
Установлено, что амплитуда вспышки ХЛ, вызванной добавлением к биоматериалу инициаторов реакций ПОЛ (ионы  $Fe^{2+}$ ), положительно коррелирует с концентрацией продуктов СРО в образце и отрицательно коррелирует с содержанием молекул, тормозящих эти реакции – антиоксидантов (АО).

Данные такого исследования являются дополнительными для постановки диагноза, для контроля эффективности лечения и прогноза для пациента.

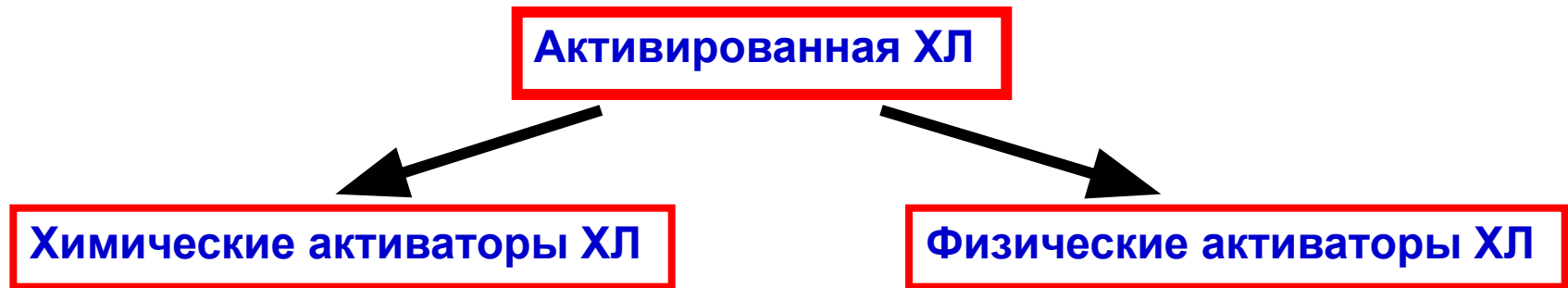
Пример регистрации кинетики ХЛ (красная линия), накопления продукта реакций ПОЛ (МДА – фиолетовая линия) и окисления ионов  $Fe^{2+}$  (голубая линия) в суспензии липосом



# Типичная кривая вспышки ХЛ и её параметры



# Активированная ХЛ



## 1. Химические активаторы ХЛ (хемиллюминогенные зонды).

Существуют вещества, способные взаимодействовать со СР. В результате образуются соответствующие продукты, находящиеся в электронно-возбужденном состоянии. В итоге, в системе, наряду с возбужденными продуктами взаимодействия между СР, появляются ещё и возбуждённые продукты реакции между СР и химическими активаторами.

Благодаря этому, увеличивается доля возбужденных молекул по отношению к общему числу молекул. В результате свечение становится более интенсивным.



$R^*$  - CP

$A$  - химический активатор

$P_A^*$  – продукт превращения химического активатора в возбуждённом состоянии (обеспечивает ХЛ)

$P_A$  – продукт в основном (невозбужденном) состоянии

Примеры химических активаторов ХЛ (хемилюми-  
ногенных зондов):

**Люминол** (3-аминофталевый гидразид) – обеспечивает интенсивное свечение в присутствии **НО\*** (свободный радикал гидроксида). Усиливает ХЛ в 70 раз.

**Люцигенин** (бис(N-метилакридиний)) - обеспечивает интенсивное свечение в присутствии **\*O<sub>2</sub><sup>-</sup>** (супероксидный анион-радикал кислорода).

## 2. Физические активаторы

Эти молекулы не вступают в химические реакции со СР.

В основе усиления ими ХЛ лежит **физический перенос энергии с молекулы продукта ХЛ-реакции на молекулу активатора:**



**P\*** - продукт ХЛ-реакции в возбужденном состоянии

**V** – физический активатор в основном (невозбужденном) состоянии

**V\*** - физический активатор в возбужденном состоянии



Примеры физических активаторов ХЛ (для реакций СРО липидов, т.е. детекция СР липидов –  $L^*$ ,  $LO^*$  и  $LOO^*$ ):

**Родамин** – усиливает ХЛ в 37 раз

**Кумарин С-525** - усиливает ХЛ в 1500 раз. При этом на величину ХЛ не влияет присутствие АФК.

# Применение активированной ХЛ

## 1. Обнаружение веществ – катализаторов, разлагающих $\text{H}_2\text{O}_2$ с образованием $\text{CP}$

$\text{H}_2\text{O}_2$  – естественный продукт аэробного метаболизма. В норме  $\text{H}_2\text{O}_2$  не накапливается в опасных концентрациях благодаря работе АО фермента **каталазы**.

В условиях окислительного стресса  $\text{H}_2\text{O}_2$  реагирует с ионами металлов с переменной валентностью (прежде всего с ионами  $\text{Fe}^{2+}$ ) или с геминными соединениями. В результате образуется **\*ОН – радикал** – сильнейший окислитель с мощным цитотоксическим действием.

## **1.1. Обнаружение миоглобина в биологических жидкостях.**

**При инфаркте миокарда в моче больного появляется миоглобин (выходит из некротизированных кардиомиоцитов). Миоглобин разрушает  $\text{H}_2\text{O}_2$  и продукты этой реакции взаимодействуют с люминолом, обеспечивая интенсивную ХЛ. Интенсивность ХЛ пробы мочи пропорциональна масштабам повреждения миокарда. Такая лабораторная проба может служить для подтверждения инфаркта, а также критерием как тяжести патологического процесса, так и эффективности терапии.**

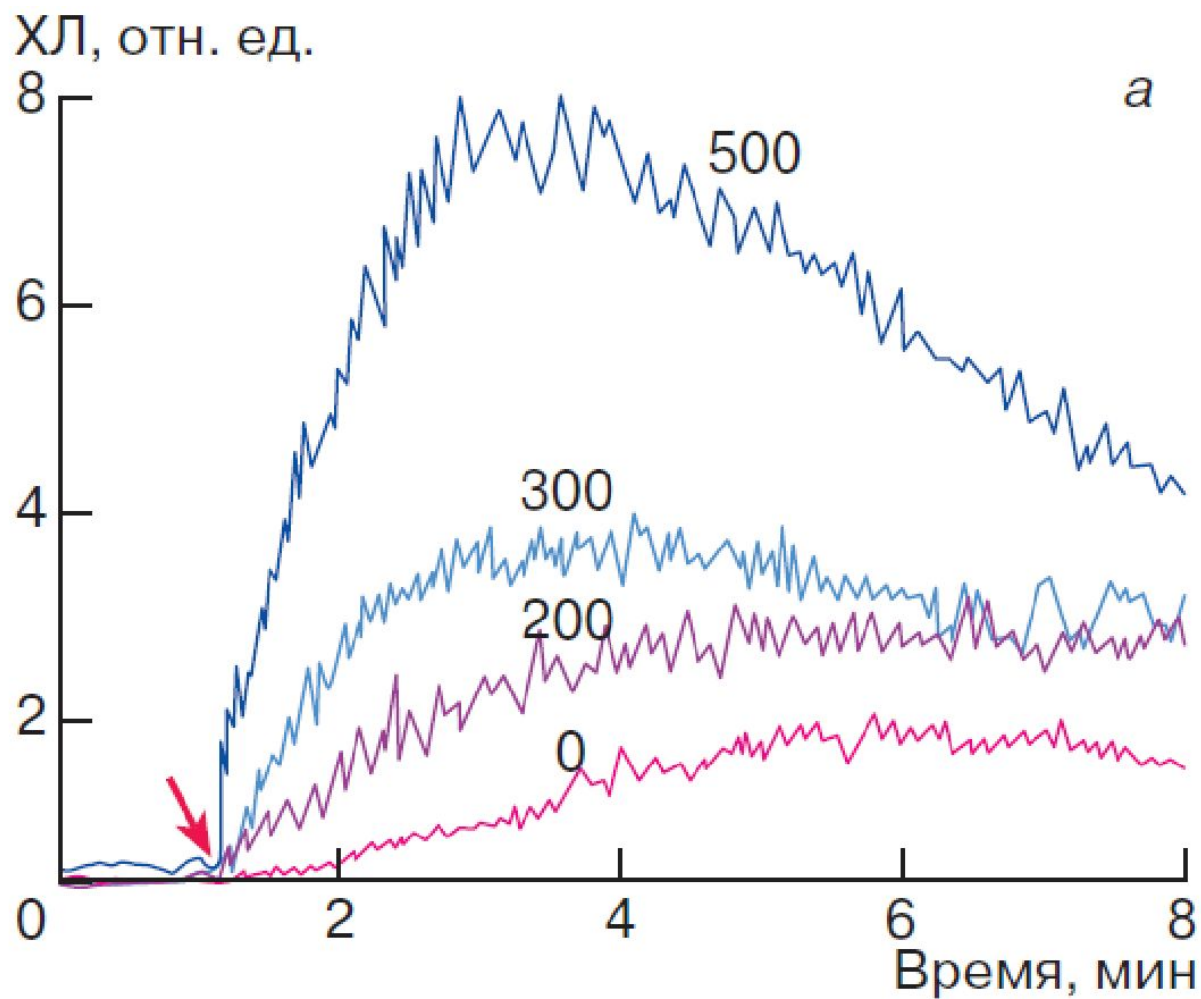
## 1.2. ХЛ раневого экссудата.

Реакция воспаления обеспечивает присутствие в экссудате  $H_2O_2$ , гемсодержащих белков и др. СР. Проба экссудата в присутствии люминола даст интенсивную ХЛ, её величина будет пропорциональна концентрации СР в экссудате. В свежей ране, когда активность воспаления максимальна – ХЛ будет наибольшей. По мере заживления раны (в том числе под действием адекватного лечения) интенсивность ХЛ в присутствии люминола будет уменьшаться. Контроль эффективности лечения раны и оперативная коррекция схемы лечения.

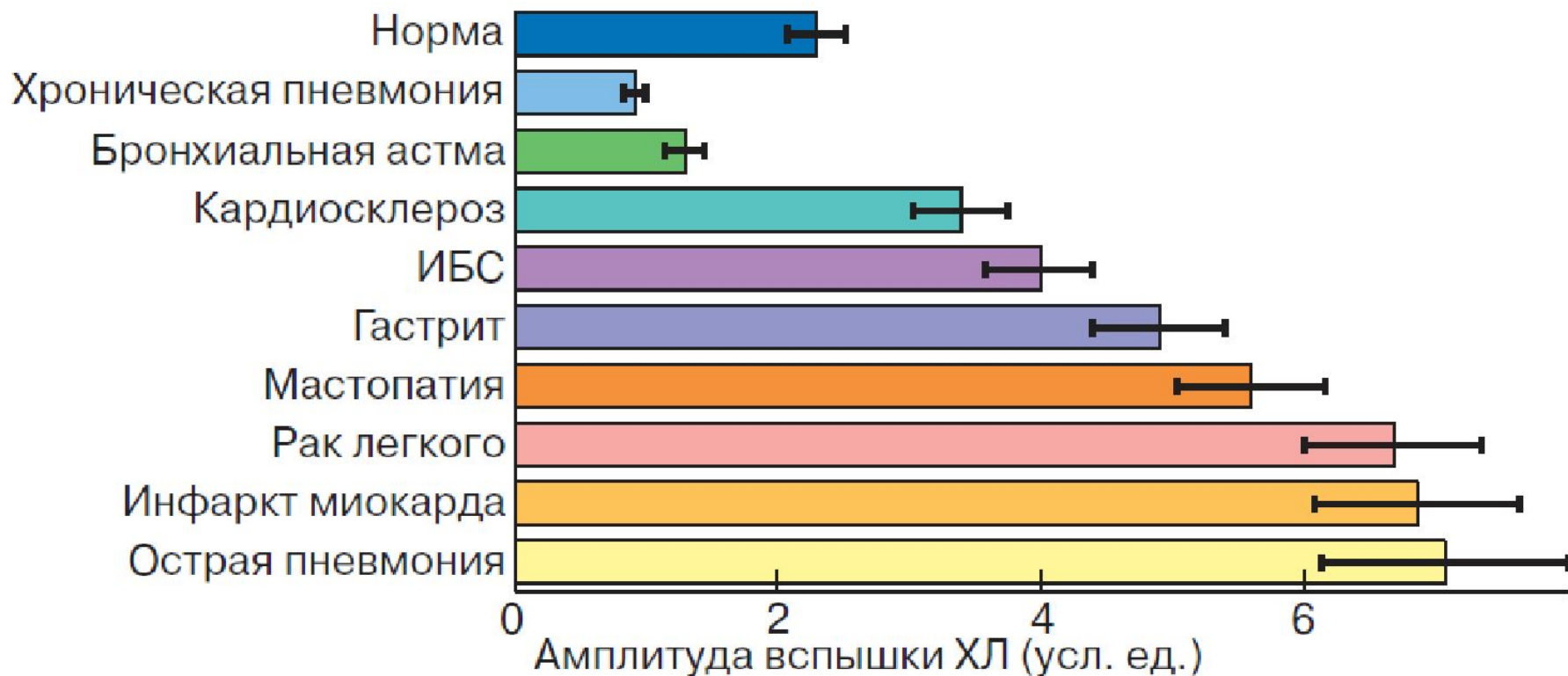
### 1.3. ХЛ клеток – фагоцитов.

Фагоцитирующие клетки (гранулоциты, моноциты, тканевые макрофаги) продуцируют АФК, с помощью которых уничтожаются чужеродные (патогенные) клетки – защитная функция фагоцитов. АФК в присутствии люминола (или люцигенина) дают интенсивную ХЛ. Активированная ХЛ является важным показателем функционального состояния фагоцитирующих клеток организма.

*In vitro* стимуляцию выделения АФК фагоцитирующими клетками можно вызвать добавлением в среду инкубации суспензии бактерий, ЛПС, с помощью электрических импульсов и др. Далее, в присутствии люминола, регистрируют интенсивность ХЛ.



**Люминол-активированная ХЛ фагоцитирующих клеток крови, стимулированных электрическими импульсами (цифры у кривых – сила эл. импульса, вольт)**



**Амплитуда люминол-активированной ХЛ лейкоцитов крови больных с различными хроническими патологиями в стадии обострения. Фагоцитирующую активность клеток стимулировали внесением в среду инкубации частичек латекса.**

**Вышеуказанные патологические процессы имеют в своем патогенезе – реакцию воспаления (окислительный стресс).**

## Хемилюминесценция цельной крови пациентов с различными заболеваниями

