

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.

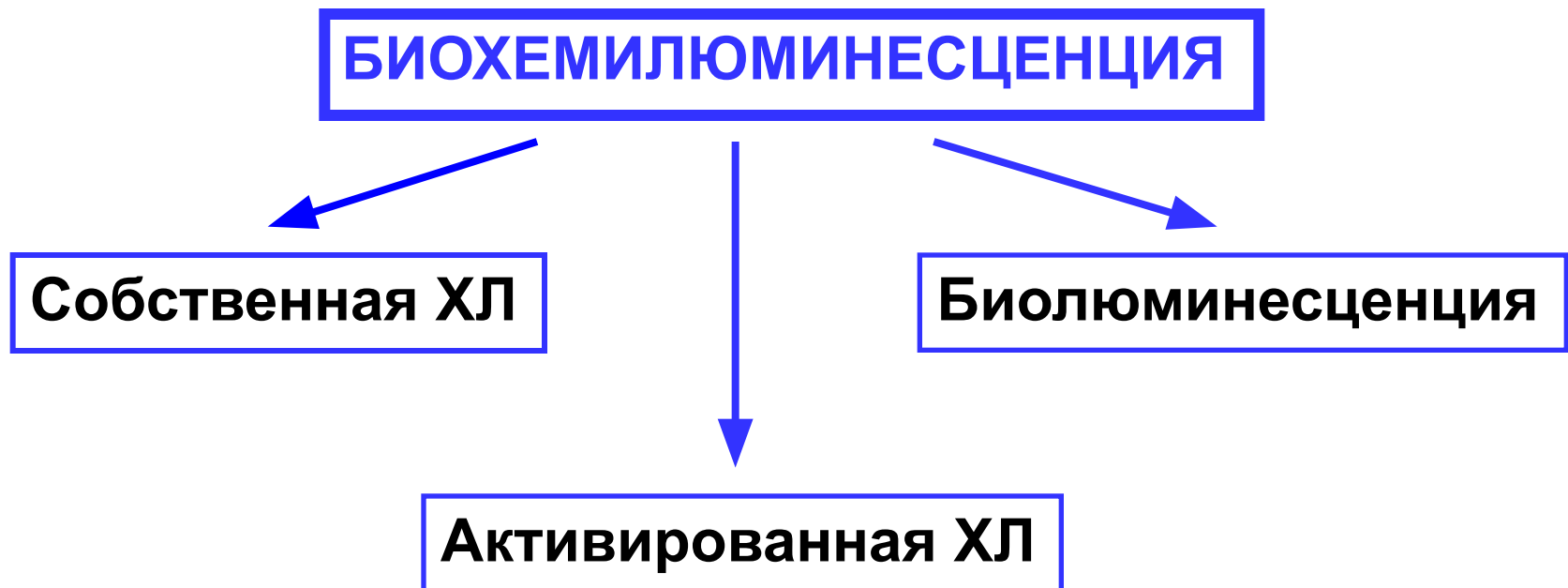
Хемилюминесценция (ХЛ) - свечение, сопровождающее химические реакции.

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

ХЛ в биосистемах - **биохемилюминесценция**

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

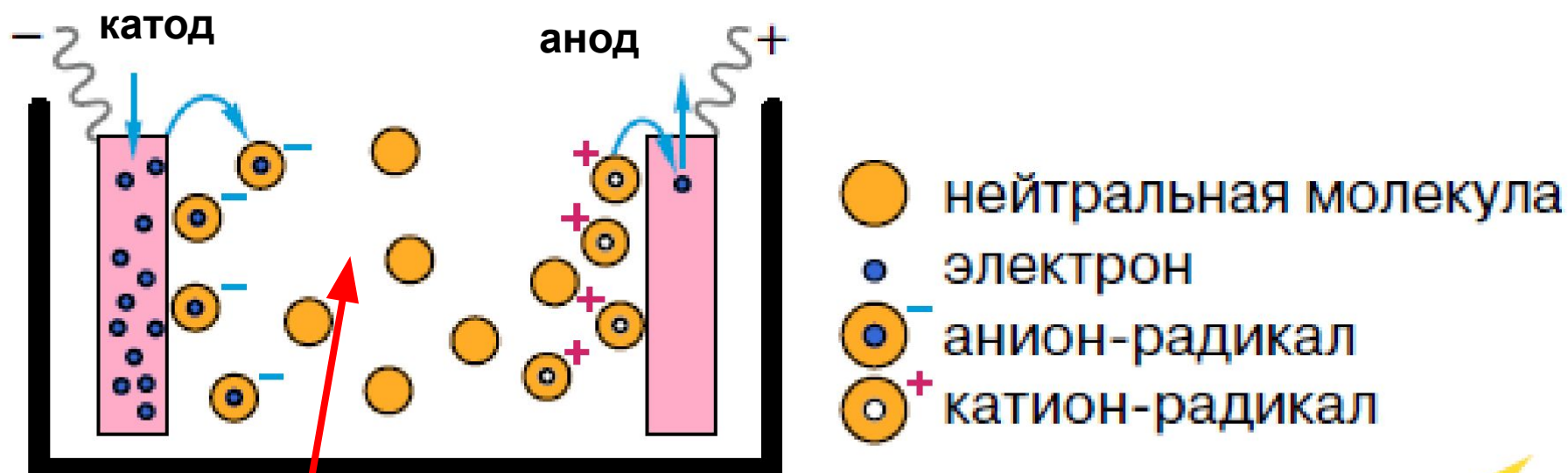
Классификация ХЛ в биосистемах



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)

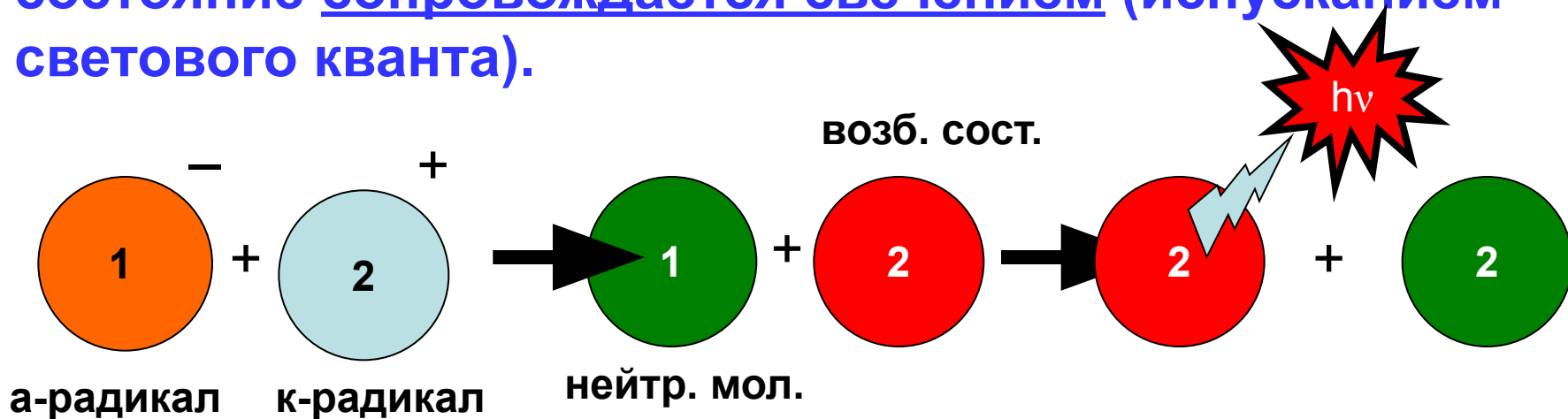


Раствор полициклических углеводородов (пирен, антрацен и др.), способных к люминесценции

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:

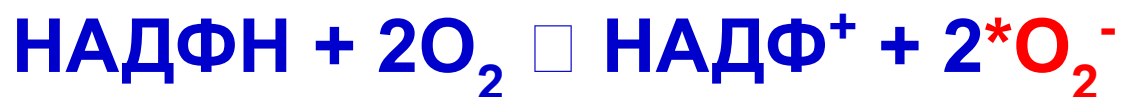
Собственное свечение клеток и тканей с участием активных форм кислорода

Активные формы кислорода (АФК):

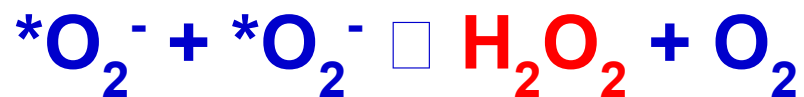
- перекись водорода (H_2O_2 □ H-O-O^*)
- супероксидный анион-радикал кислорода ($^*\text{O}_2^-$)
- радикал гидроксила (HO^*)
- гипохлорит (ClO^-)

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

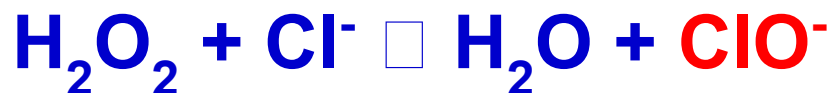
В мембранах макрофагов содержится НАДФН-оксидазный комплекс, с помощью которого НАДФН окисляется в результате восстановления двух молекул кислорода до $^*\text{O}_2^-$:



Супероксидные радикалы кислорода рекомбинируют между собой с образованием H_2O_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:



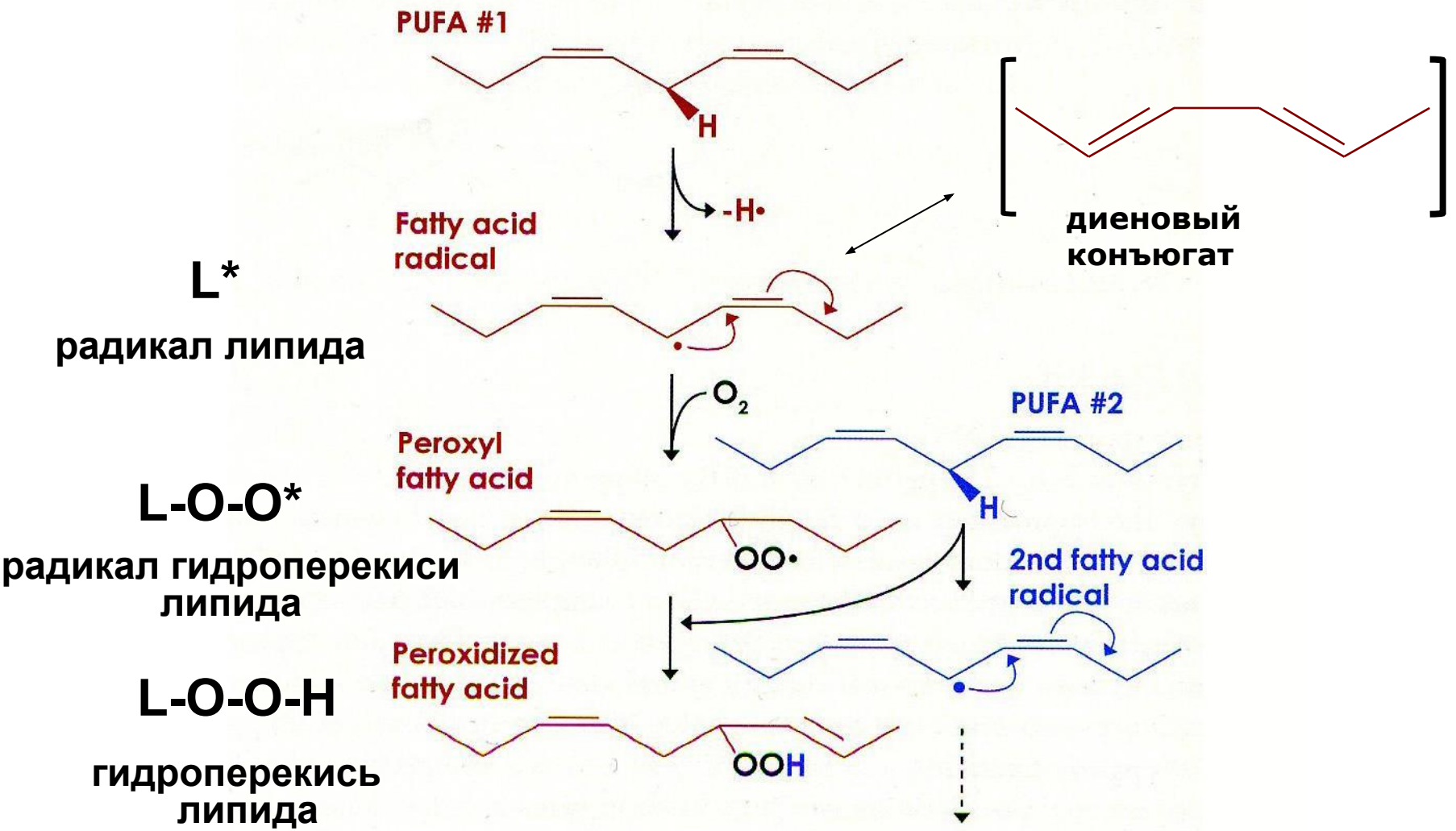
1. Синглетный кислород **переходит в основное (триплетное) состояние** с испусканием **кванта света в ИК-области**:



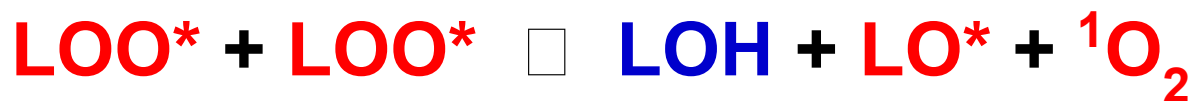
2. Синглетный кислород способен также образовывать **димеры (эксимеры)**, которые переходят в основное состояние **с испусканием квантов с $\lambda = 635, 580$ и 535 нм (видимая область спектра)**.

Образование гидроперекиси ПНЖК и её радикала

PUFA – PolyUnsaturated Fatty Acid = ПНЖК



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



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



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

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.

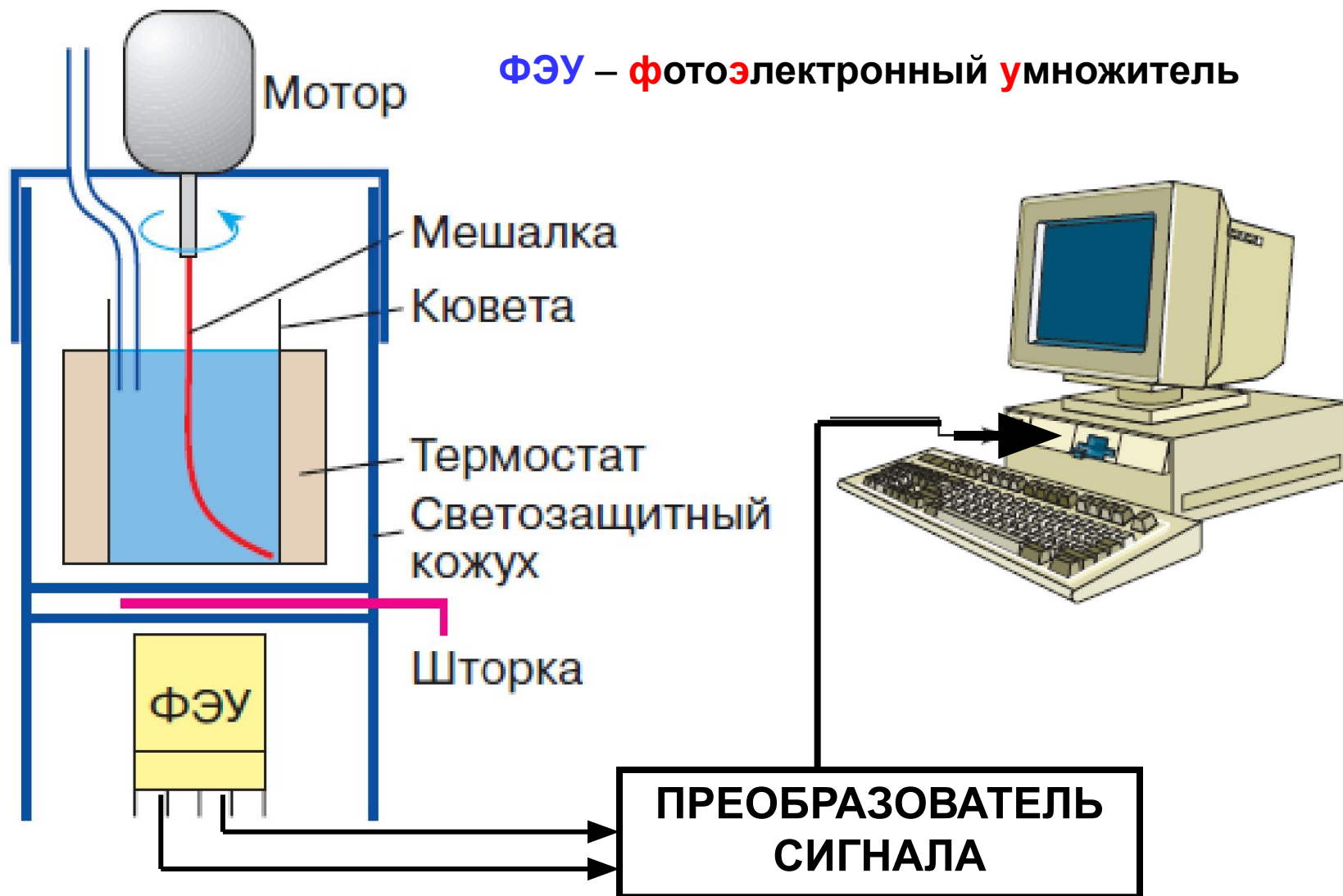
Причины чрезвычайно низкой интенсивности собственной ХЛ клеток и тканей («сверхслабое свечение»)

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** ($J_{ХЛ}$) 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 $J_{ХЛ}$ 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.

Для чего используют измерение собственной (неактивированной) ХЛ

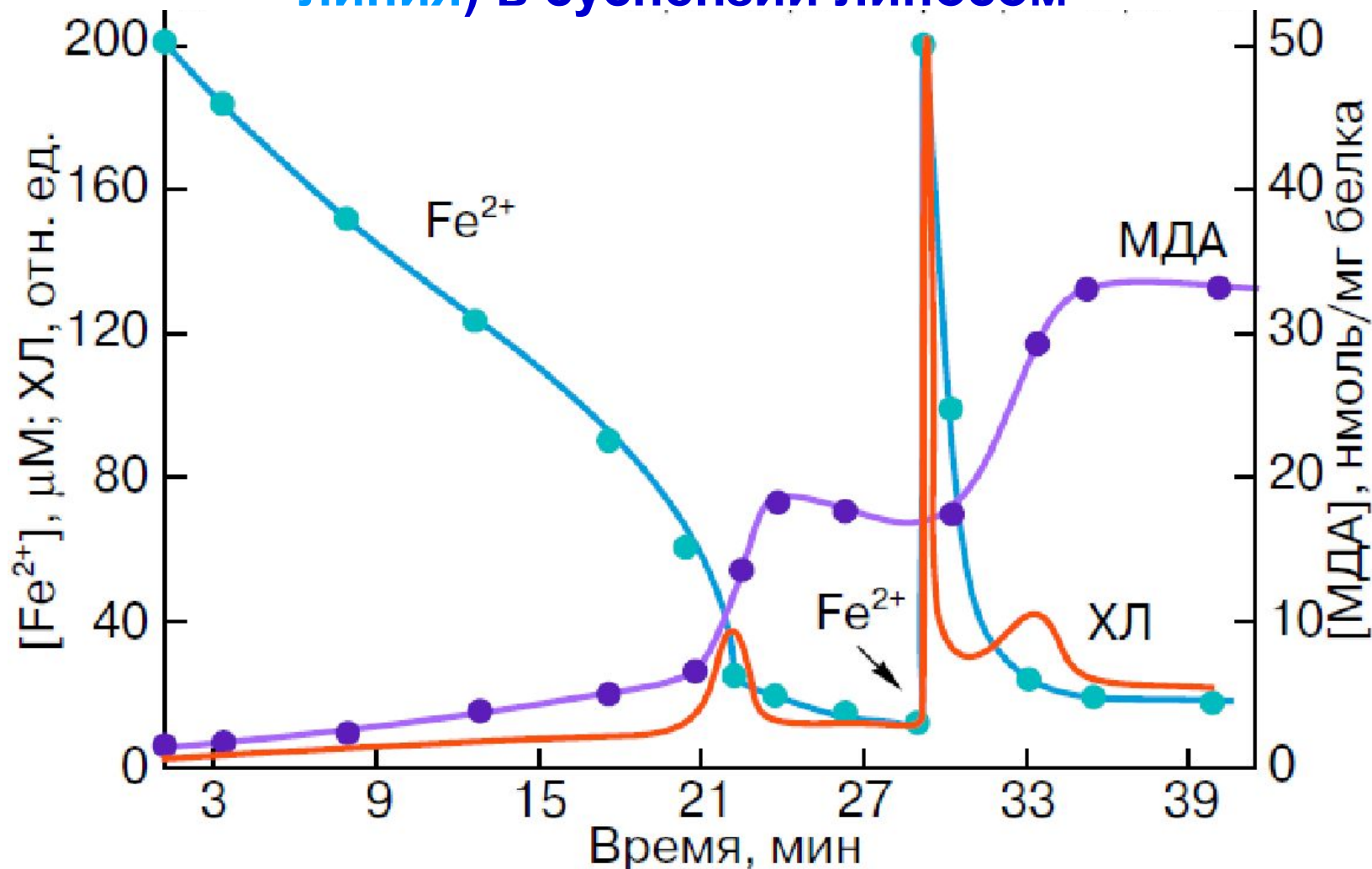
1. Изучение фундаментальных механизмов протекания реакций ПОЛ в живых системах, их регуляции и механизмов действия АО различной природы:
Антиперекисные АО – разрушают уже образовавшиеся органические гидроперекиси и
Антирадикальные АО или «ловушки» **СР** – уничтожают СР).

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

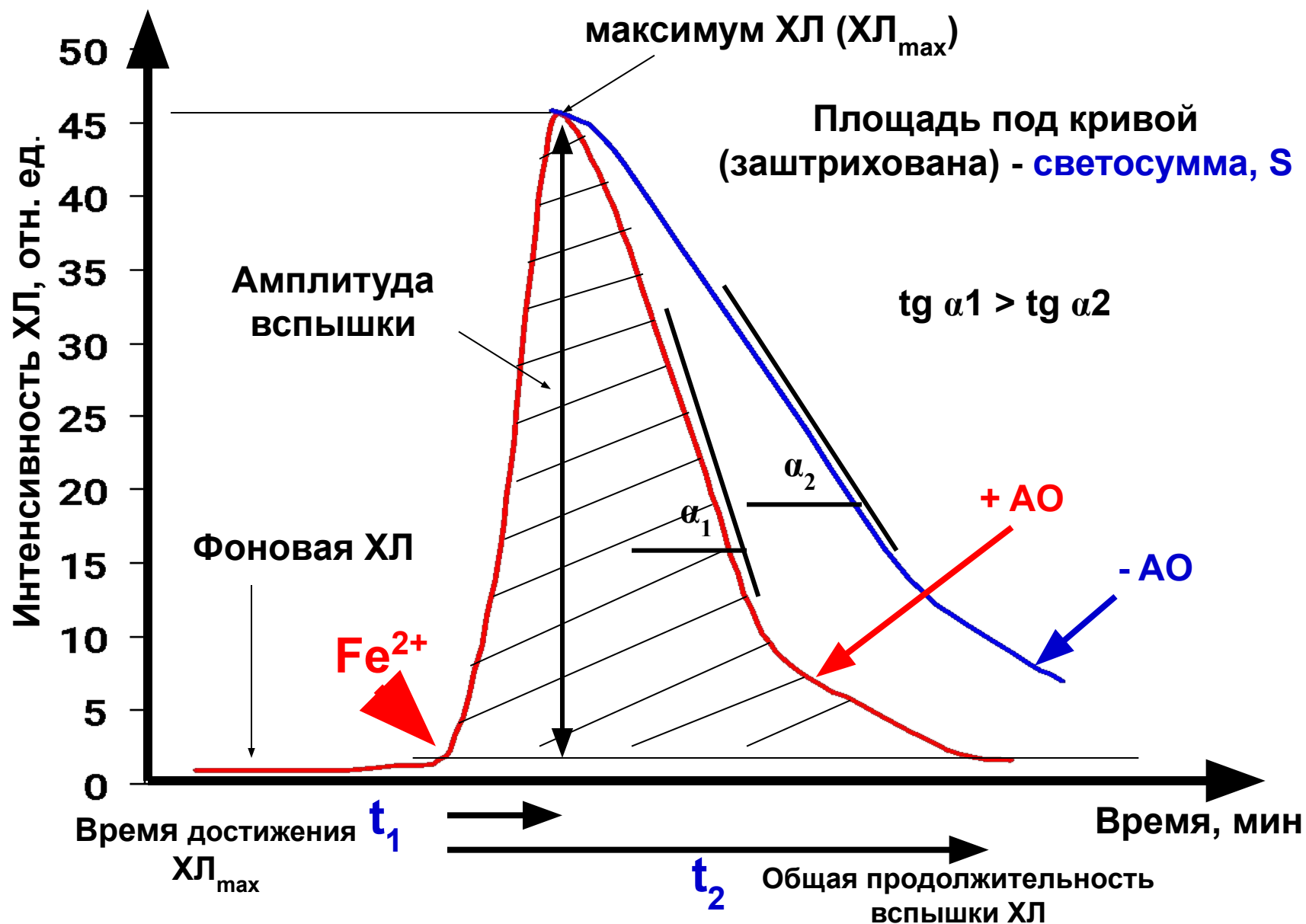
Установлено, что амплитуда вспышки ХЛ, вызванной добавлением к биоматериалу инициаторов реакций СРО (ионы Fe^{2+}), положительно коррелирует с концентрацией продуктов СРО в образце и отрицательно коррелирует с содержанием молекул, тормозящих эти реакции – антиоксидантов (АО).

Данные такого исследования являются дополнительными для оценки тяжести состояния пациента, для контроля эффективности лечения и прогноза для пациента.

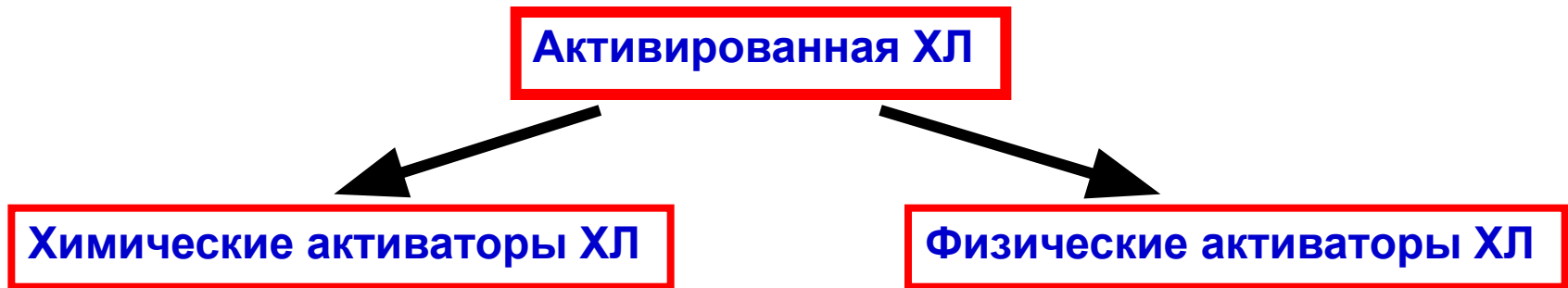
Пример регистрации кинетики ХЛ (красная линия), накопления продукта реакций ПОЛ (МДА – фиолетовая линия) и окисления ионов Fe^{2+} (голубая линия) в суспензии липосом



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):

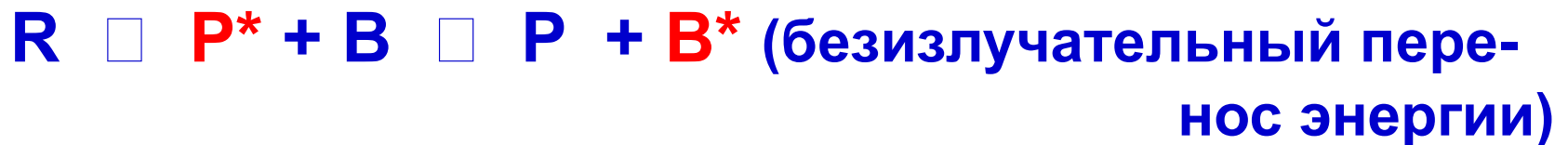
Люминол (3-аминофталевый гидразид) – обеспечи-
вает интенсивное свечение в присутствии **НО*** (сво-
бодный радикал гидроксида). Усиливает ХЛ в 70 раз.

Люцигенин (бис(N-метилакридиний) - обеспечивает
интенсивное свечение в присутствии ***O₂⁻** (суперок-
сидный 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.

Для чего используют измерение активированной ХЛ

1. Обнаружение веществ – катализаторов, разлагающих H_2O_2 с образованием СР.

H_2O_2 – естественный продукт аэробного метаболизма. В норме H_2O_2 не накапливается в опасных концентрациях благодаря работе АО фермента **каталазы**.

В условиях окислительного стресса H_2O_2 реагирует с ионами металлов с переменной валентностью (прежде всего с ионами Fe^{2+}) или с геминовыми 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 появля-ется миоглобин (выходит из некротизированных кардиомиоцитов). Миоглобин разрушает H_2O_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 других СР. Проба экссудата в присутствии люминола даст интенсивную ХЛ, её величина будет пропорциональна концентрации СР в экссудате.

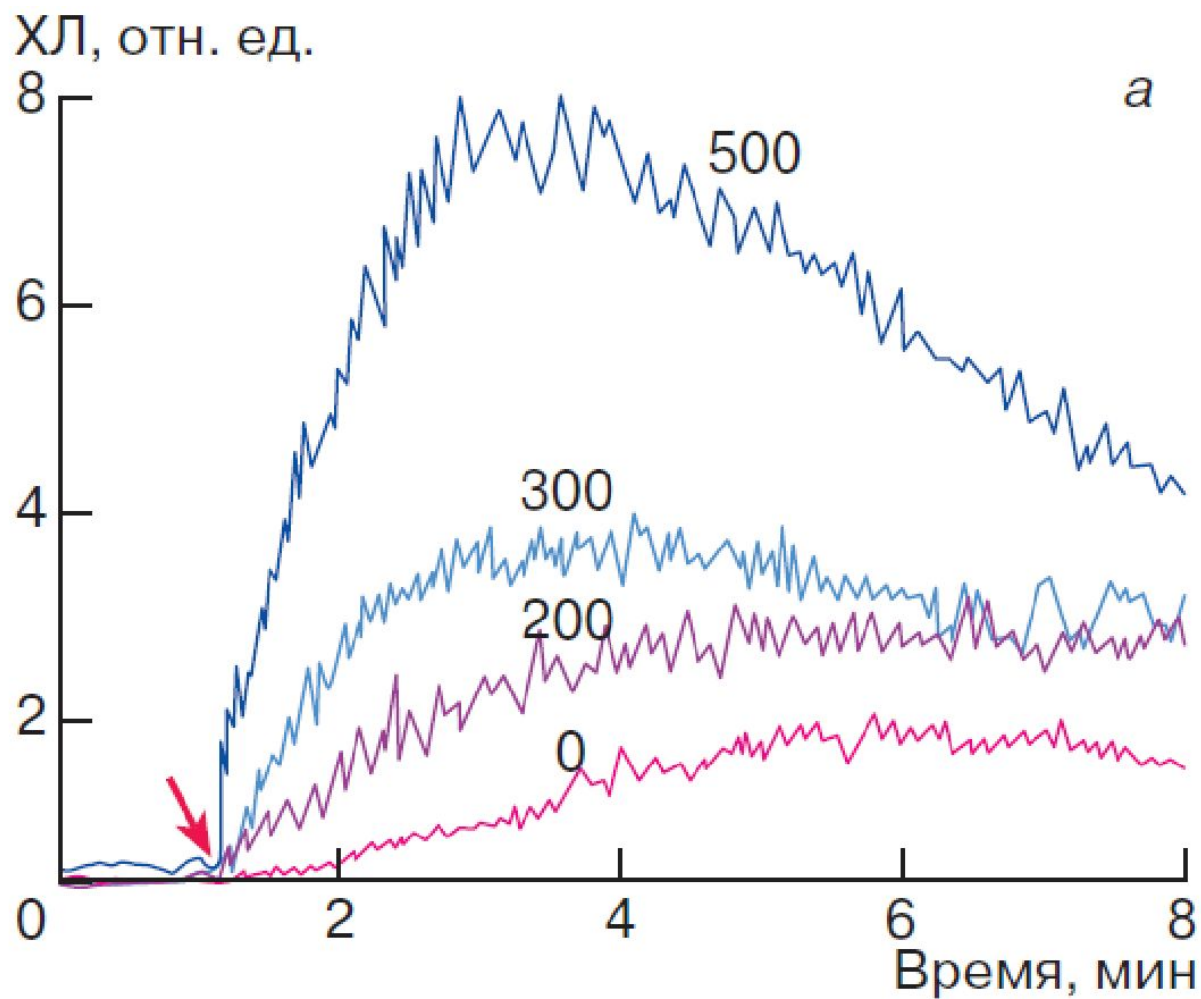
В свежей ране, когда активность воспаления максимальна – ХЛ будет наибольшей. По мере заживления раны (в том числе под действием лечения) интенсивность ХЛ в присутствии люминола будет уменьшаться.

Контроль эффективности лечения раны и оперативная коррекция схемы лечения.

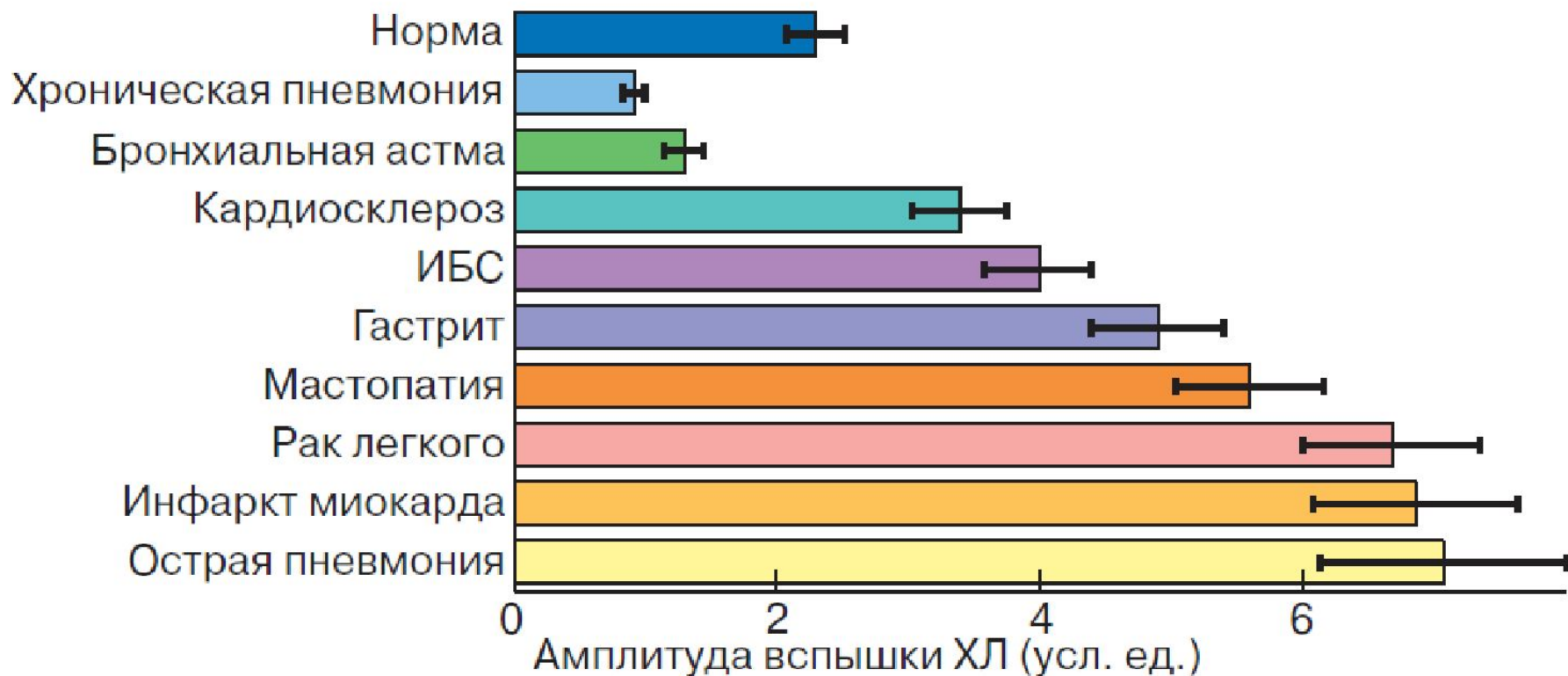
1.3. ХЛ клеток – фагоцитов.

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

