

О. С. Черненко

БІОФІЗИКА НЕІОНІЗУЮЧИХ ВИПРОМІНЮВАНЬ

КУРС ЛЕКЦІЙ



МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ імені І. І. МЕЧНИКОВА

О. С. Черненко

**БІОФІЗИКА НЕІОНІЗУЮЧИХ
ВИПРОМІНЮВАНЬ**

КУРС ЛЕКЦІЙ

ОДЕСА
ОНУ
2022

УДК 577.35
Ч-49

Рецензенти:

Ю. А. Ніцук, доктор фізико-математичних наук, професор кафедри експериментальної фізики Одеського національного університету імені І. І. Мечникова;

О. В. Мандель, кандидат фізико-математичних наук, доцент кафедри біофізики, інформатики і медичної апаратури Одеського національного медичного університету.

*Рекомендовано до друку науково-методичною радою
ОНУ імені І. І. Мечникова.
Протокол № 4 від 25 серпня 2022 р.*

Черненко О. С.

Ч-49 Біофізика неіонізуючих випромінювань : курс лекцій . /
О. С. Черненко. – Одеса : Одес. нац. ун-т. ім. І. І. Мечникова,
2022. – 122 с.

ISBN 978-617-689-509-1

«Біофізика неіонізуючих випромінювань» як дисципліна професійного напрямку направлена на ознайомлення студентів з основними фізичними методами дослідження біологічних об'єктів, з енергетикою процесів в живих організмах; формування цілісного і науково обґрунтованого погляду на різноманітні прояви взаємодії електромагнітного поля з біотканинами; розширення та поглиблення знань з питань дії світла на біологічні системи; вивчення фундаментальних основ фотобіологічних процесів і механізму фотодинамічних і фототермічних реакцій в біологічних процесах.

Курс лекцій призначений для теоретичних занять по курсу «Біофізика неіонізуючих випромінювань» для студентів (магістрів), що спеціалізуються в області прикладної та медичної фізики.

УДК 577.35

ISBN 978-617-689-509-1

© Черненко О. С., 2022

© Одеський національний університет
імені І. І. Мечникова, 2022

ЗМІСТ

Вступ	5
Розділ 1. ПОГЛИНАННЯ СВІТЛА БІОЛОГІЧНИМИ ОБ'ЄКТАМИ.....	7
1.1. Особливості взаємодії електромагнітного випромінювання різного діапазону з біологічними об'єктами	7
1.2. Характеристики світлового випромінювання	11
1.3. Розсіяння і поглинання світла.....	12
1.4. Поглинання монохроматичного світла	14
1.5. Ефект багатократного розсіяння.....	16
1.6. Ефект сит	17
1.7. Спектр поглинання.....	19
1.8. Аналіз спектрофотометрії	23
Розділ 2. ФОТОЛЮМІНЕСЦЕНЦІЯ БІОЛОГІЧНИХ СИСТЕМ.....	26
2.1. Флуоресценція	26
2.2. Чинники, що впливають на спектр люмінесценції.....	30
2.3. Гасіння флуоресценції	33
2.4. Фосфоресценція.....	38
2.5. Сенсibiliзуюча флуоресценція	40
2.6. Застосування флуоресценції	46
Розділ 3. ХЕМІЛЮМІНЕСЦЕНЦІЯ	49
3.1. Механізм виникнення хемілюмінесценції.....	49
3.2. Види хемілюмінесценції.....	52
3.3. Біоломінесценція	57
Розділ 4. ФОТОБІОЛОГІЧНІ ПРОЦЕСИ	66
4.1. Загальні особливості	66
4.2. Фотохімічні процеси	69
Розділ 5. ДІЯ УЛЬТРАФІОЛЕТОВОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ НА БІОЛОГІЧНІ МОЛЕКУЛИ	72
5.1. Синтез вітаміну D.....	73
5.2. Фотобіологічні процеси в шкірі.....	74

5.3. Пігментація шкіри (засмага)	79
5.4. Абіогенний вплив ультрафіолету	82
5.5. Фотохімічне пошкодження ультрафіолетового випромінювання	85
Розділ 6. ФОТОСИНТЕЗ.....	91
6.1. Загальні поняття	91
6.2. Фотохімічні стадії фотосинтезу	93
Розділ 7. БІОФІЗИКА ЗОРУ	99
7.1.Будова ока	99
7.2. Будова і функції паличок.....	101
7.3. Фотоперетворення родопсину	103
7.4. Рецепторні потенціали і молекулярний механізм зору	105
7.5. Кольоровий зір.....	108
7.6. Фотопошкодження очей	109
Розділ 8. ФОТОРЕГУЛЯТОРНІ СИСТЕМИ	111
8.1. Фототаксис	111
8.2. Фотокінез.....	112
8.3. Фототропізм	113
8.4. Фотоморфогенез	114
8.5. Фотоперіодизм.....	115
Розділ 9. ВИПРОМІНЮВАННЯ РАДІОЧАСТОТНОГО ДІАПАЗОНУ	117
9.1. УВЧ і СВЧ випромінювання	117
9.2. КВЧ-випромінювання	119
9.3. Террагерцове випромінювання	120
Список використаної літератури:.....	121

Вступ

При взаємодії світла з речовиною може відбуватися заломлення світлових променів і їх розсіяння (розсіяння вперед, зворотнє розсіяння), або поглинання фотонів молекулами, або те і інше разом (рис. 1.1). Якщо відбулося поглинання кванта світла молекулою, то через 10^{-9} – 10 с може відбуватися випускання частини поглиненої енергії у вигляді кванта світла з більшою довжиною хвилі (люмінесценція). Частина поглиненої енергії може перейти в теплову енергію молекул.

Вивчення поглинання фотонів і люмінесценції дозволяє судити про будову молекул, що поглинають світло, або ділянок молекули (хромофорів), а також проводити якісний і кількісний аналіз, з'ясувати фізико-хімічні властивості середовища, навколишньої молекули або їх хромофорні групи.

Дія світла на живі організми вельми різноманітна. Фотосинтез, фототропізм, фотоперіодизм і фототаксис, зорове сприйняття, почервоніння шкіри при УФ опромінюванні, утворення вітаміну D, бактерицидна і мутагенна дія УФ випромінювання, фотодинамічні ефекти – всі ці процеси викликаються дією світла. Вивчення початкових стадій фотобіологічних процесів, які закінчуються утворенням перших стійких хімічних сполук, можна вважати областю біофізики. Подальші процеси відбуваються по біохімічних і фізіологічних законах.

Явища, що протікають на перших, біофізичних стадіях: поглинання світла; перерозподіл енергії в молекулі, що знаходиться в електронному збудженому стані; міжмолекулярний перенос енергії; утворення первинних фотопродуктів і перетворення їх в перші хімічні стійкі сполуки, виявляються загальними для всіх фотобіологічних процесів.

Схожі в загальних рисах і основні методи дослідження таких про-

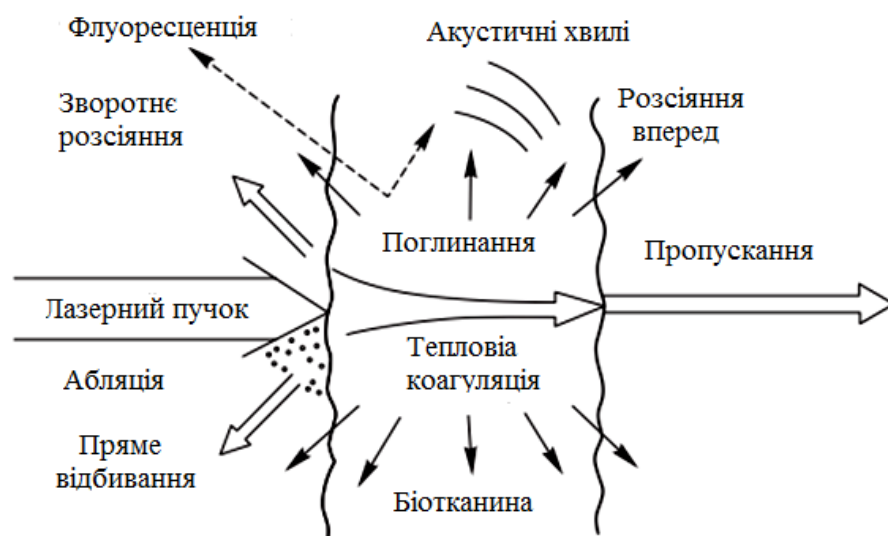


Рис. 1.1. Види взаємодії лазерного випромінювання з біотканиною

цесів: спектроскопія і люмінесцентний аналіз; імпульсне опромінювання об'єктів з поєднанні з швидкодіючими методами реєстрації оптичних змін в них; використання низьких температур для вивчення нестабільних проміжних продуктів і фосфоресценції і ін.

В даному курсі лекцій пропонується стисле викладення матеріалу, який в більш розширеному вигляді представлений в літературі, що наведена в списку використаних джерел. Укладач вдячний дослідникам, що дають змогу розібратися з механізмами протікання широкого кола процесів за участі неіонізуючого випромінювання.

Розділ. 1. ПОГЛИНАННЯ СВІТЛА БІОЛОГІЧНИМИ ОБ'ЄКТАМИ

1.1. Особливості взаємодії електромагнітного випромінювання різного діапазону з біологічними об'єктами

Кожна молекула має серію заповнених і вільних електронних. Взаємодія світла і живої матерії починається з акту поглинання фотона і переходу молекул в збуджений стан.

Світлове випромінювання (від ультрафіолетового (УФ) до інфрачервоного (ІЧ)) – володіє великою специфічністю по відношенню до біологічних систем, чим короткохвильове (рентгенівське і γ -випромінювання) або довгохвильове електромагнітне випромінювання радіодіапазону, що пов'язане з великою різноманітністю процесів взаємодії світла з молекулами (дисоціація, електронне збудження, коливальне і оберতальне збудження (рис. 1.2).

Фотони малих енергій (дальнє ІЧ, терагерцеве випромінювання, випромінювання крайнє високих частот КВЧ і надвисоких частот НВЧ) можуть надавати селективну дію на деякі біомолекули і їх комплекси. Наприклад, це відбувається за рахунок збудження оберতальных рівнів, механічних коливань макромолекул або акустичних коливань в клітинних мембранах. Звичайна їх дія зводиться до теплової.

Фотони рентгенівського і γ -випромінювання мають настільки високу енергію, що можуть з однаковою ефективністю іонізувати будь-яку

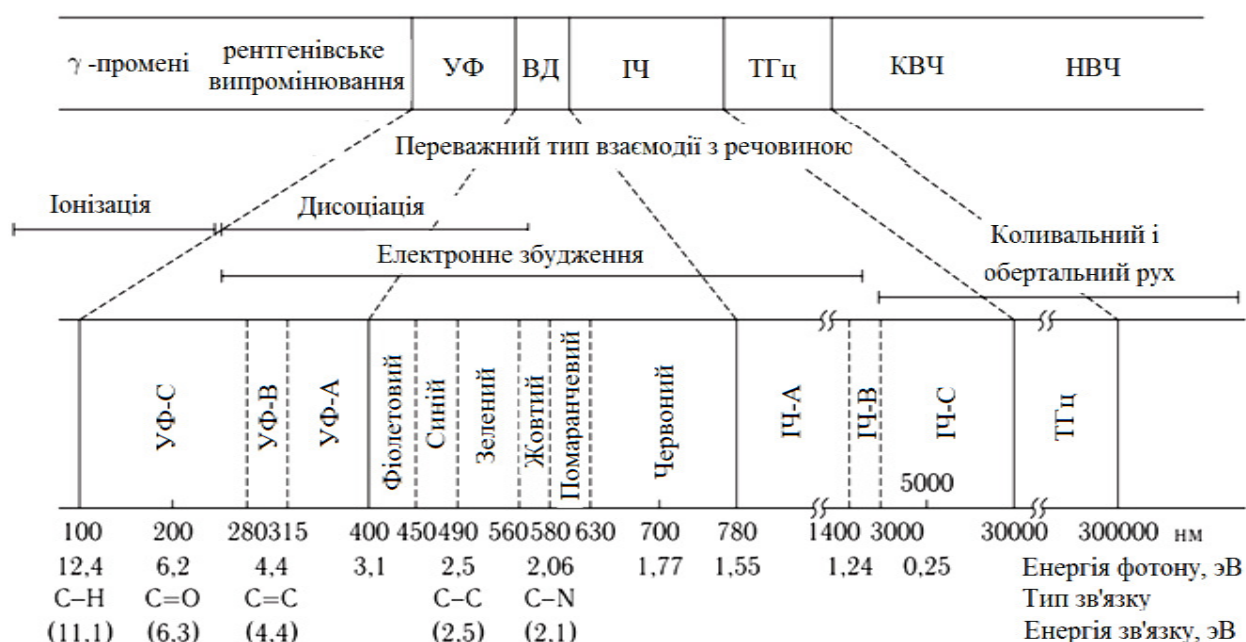


Рис. 1.2. Шкала електромагнітних хвиль і типи взаємодій випромінювання з речовиною (УФ – ультрафіолетове, ВД – видимий діапазон, ІЧ – інфрачервоне, ТГц – терагерцовий діапазон, КВЧ – крайнє високі частоти радіодіапазону, НВЧ – надвисокі частоти радіодіапазону)

молекулу, що входить до складу складноорганізованої біологічної матерії. Тому така взаємодія не залежить від хімічної природи молекули.

Лазерне випромінювання помірної інтенсивності надає неспецифічну теплову, а високій інтенсивності – руйнуючу (деструктивну) дію на біологічні об'єкти (абляція, фотокоагуляція) (рис. 1.1). Особливістю лазерного випромінювання є здійснення дії в дуже малих об'ємах (в межах клітки або навіть її частин).

Окрім фізико-хімічних проявів світлового випромінювання необхідно враховувати вплив світла на функціонування живої матерії, що визначається ступенем гомеостазу живого об'єкту. Випромінювання малої інтенсивності не запускає адаптаційні механізми біосистеми. При невеликому збільшенні інтенсивності відбуваються лише збурення локального гомеостазу, які не завжди можуть бути виявлені. Зростання інтенсивності включає загальні адаптаційні і регуляційні механізми живого об'єкту, які при не дуже високій інтенсивності здатні повністю відновити систему. При подальшому збільшенні інтенсивності вони вже не справляються з повним відновленням системи і починають відбуватися частково необоротні процеси. З часом необоротні зміни нарастають і відбувається руйнування в системі, яку можна продовжувати вважати «живою». При ще більших інтенсивностях руйнування стають настільки значними, що система перестає бути «живою».

Для взаємодії світла з біологічними є важливими час опромінювання, режим опромінювання (безперервний або імпульсний), періодичність і тривалість процесів. Залежно від довжини хвилі і інтенсивності світла порогова тривалість опромінювання, при якій починають відбуватися морфологічні зміни, може бути вельми різною для одного і того ж об'єкту. Тобто для живого об'єкту добуток інтенсивності на час опромінювання не є константою. В залежності від періодичності світлових імпульсів можливі резонансні явища в області частот, відповідних періоду коливань фотовідгуку біологічних систем, який змінюється в межах від 10^{-3} до 10^3 с.

Основним джерелом природного фону радіохвиль на Землі є атмосферні електричні явища (грози, блискавки), радіовипромінювання Сонця і зірок. Інтенсивність фону складає в середньому приблизно 10^{-7} Вт/м².

Основним природним джерелом випромінювання в ІЧ, видимому і УФ-діапазонах є Сонце, а в рентгенівському і γ-діапазонах також міжзор'янні і галактичні події (утворення наднових зірок, квазари, пульсари та ін.)

Фонова інтенсивність в цих діапазонах залежить від багатьох чинників, зокрема від стану атмосфери та іоносфери, магнітного поля Землі, сонячної активності та ін.

Таблиця 1.1
Властивості електромагнітного випромінювання

	Радіохвилі	Інфрачервоне випромінювання	Видиме випромінювання	Ультрафіолетове випромінювання	Рентгенівське випромінювання	Гамма-випромінювання
Довжина хвилі	$10^3\text{м} - 1\text{мм}$	$1\text{мм} - 0.76\text{мкм}$	$760 - 380\text{нм}$	$380-10\text{нм}$	$80 - 10^{-4}\text{нм}$	0.1нм і менше
Частота хвилі	$3 \dots 3 \cdot 10^{11}$	$3 \cdot 10^{11} \dots 3.95 \cdot 10^{14}$	$3.95 \cdot 10^{14} \dots 7.9 \cdot 10^{14}$	$7.9 \cdot 10^{14} \dots 3 \cdot 10^{16}$	$3 \cdot 10^{15} \dots 3 \cdot 10^{20}$	$3 \cdot 10^{18} \dots 3 \cdot 10^{21}$
Енергія кванта (эВ)	$1.2 \cdot 10^{-9} - 1.2 \cdot 10^{-4}$	$1.2 \cdot 10^{-4} - 1.6$	$1.6 - 3.3$	$3.3 - 120$	$10 - 0.5 \cdot 10^6$	$0.2 \cdot 10^6 \text{ і більше}$
Джерела випромінювання	Рух зарядів с прискоренням	Випромінювання молекул і атомів	Випромінювання атомів	Випромінювання атомів	Випромінювання атомів	Випромінювання збудженого ядра
Дія на речовину	Поляризація діелектриків, виникнення струмів провідності в біологічних тканинах	Фотобіологічні процеси			Когерентне розсіяння Іонізація Фото- і комптон-ефекти	
		Коливання ядер і обертання молекул	Збудження молекул	Збудження і іонізація молекул		
Біологічний ефект	Порушення водневих зв'язків і гідрофобних взаємодій, зміна гідратації і конформації молекул	Тепловий ефект. Активация терморепторів	Активация зорових репторів. Фотосинтез.	Синтез вітаміну D. Фотохімічні реакції на поверхні шкіри. Канцерогенез. Бактерицидний ефект	Первинні і вторинні радіобіологічні ефекти, які приводять до пошкодження окремих біологічно важливих молекул і організму в цілому.	
Застосування в медицині	Лікувальне прогрівання UVЧ та НВЧ	ІЧ-прогрівання	Лазерна терапія	УФ терапія захворювань шкіри та онкологічних	Рентгенографія	γ-терапія
Застосування в клінічній діагностиці	Тепловізійні методи діагностики	Люмінесцентні методи діагностики			Рентгенодіагностика, рентгенографія, рентгеноскопія	Радіонуклідна діагностика

Зокрема, джерелом електромагнітного випромінювання є організм людини. Розуміння фізичних механізмів виникнення електромагнітних хвиль відкриває можливості вивчати процеси рецепції, електрогенезу, розповсюдження нервових імпульсів в активних середовищах і цілий ряд інших життєво важливих функцій.

Радіохвилі. До радіодіапазону відносяться найдовші електромагнітні хвилі $\lambda = 3 \cdot 10^3$ до 1 м (частота 10^5 до $3 \cdot 10^8$ Гц) – довгі, середні, короткі і УКВ-діапазони з λ від 1 до 10^{-3} м (частота $3 \cdot 10^8$ – $3 \cdot 10^{11}$ Гц) – мікрохвильовий діапазон. Радіохвилі, взаємодіючи з біологічними структурами, можуть втрачати частину енергії змінного електричного поля, що перетворюється на теплоту, за рахунок генерації струмів провідності в електролітах (крові, лімфі, цитоплазмі кліток) і за рахунок поляризації діелектриків тканин організму.

Особливості розповсюдження електромагнітних хвиль радіодіапазону в живих тканинах:

1. Сильна залежність електричних властивостей (діелектрична проникність і провідність) від частоти радіохвиль.
2. Довжина хвилі електромагнітних хвиль сумірний з розмірами тіла. Наприклад при частоті 460 МГц (фізіотерапія), довжина хвилі у вільному просторі 0.7 м, а в м'яких тканинах людини тільки біля 0.1 м.
3. Для діапазону ВЧ і НВЧ унаслідок високої провідності тканин енергії електромагнітної хвилі швидко перетворюється в тепло і хвилі дуже швидко згасають по мірі проходження по тканинах тіла: згасання по потужності в $e = 2.72$ разів відбувається на відстані в 1.5 м.

Радіохвилі від штучних джерел можуть мати велику інтенсивність. Їх джерелами є радіомовні і телевізійні станції, станції стільникового зв'язку, радіолокатори і супутникові системи зв'язку. Вони можуть давати імпульсно до $30 \cdot 10^9$ Вт на частотах до 10^{10} Гц. Інтенсивність радіохвиль в 0.1 Вт/м² для людини вважається безпечною. Перебування людини в зонах з інтенсивністю вище 100 Вт/м² заборонене нормами Всесвітньої організації охорони здоров'я. Ефекти нагрівання біологічних тканин радіохвилями використовується в медицині при проведенні фізіотерапевтичних процедур за допомогою апаратів УВЧ, НВЧ-терапії, а також індуктометрії.

ІЧ і видиме випромінювання. Можуть викликати фотобіологічні процеси в біоструктурах. Видиме світло викликає в рослинах реакції фотосинтезу. При дії дальнього УФ випромінювання може відбуватися утворення вільних радикалів ароматичних і сірковмісних білків і пірімідинових основ нуклеїнових кислот.

ІЧ і видимі хвилі активують термо- і зорові рецептори, відповідно.

Дія ІЧ випромінювання на організм пов'язана, перш за все, з тепловим ефектом в поверхневих тканинах. Для прогрівання використовують короткохвильову частину ІЧ діапазону.

Випромінювання гелій-неонового лазера ($\lambda = 632 \text{ нм}$) застосовується для прискорення загоєння ран. У хірургії використовується лазерні скальпелі, здатні викликати високотемпературне руйнування тканини з одночасною коагуляцією білка. Такі операції протікають безкровно і широко практикуються при лікуванні відшаровування сітківки, глаукоми.

УФ випромінювання. Воно проникає в тканини організму на глибину до 1 мм. Поглинання УФ випромінювання пов'язане з фотохімічними реакціями і може привести до появи еритеми (почервоніння і засмага). Виділяють три зони дії УФ на організм: УФ-А – антирахітна – йде синтез вітаміну D; УФ-В – еритемна – виникає еритема; УФ-С – бактерицидна – може викликати канцерогенез, мутації, бактерицидний ефект. Остання дія використовується для дезінфекції приміщень.

Невеликі дози УФ випромінювання надають сприятливу дію на серцево-судинну, ендокринну, нейрогуморальну, дихальну системи.

Комбінована дія фотосенсибілізаторів псораленів і опромінювання УФ-А (ПУФА-терапія) широко використовується при лікуванні ряду шкірних захворювань, наприклад псоріазу, вітиліго, деяких форм облисіння.

1.2. Характеристики світлового випромінювання

Світлове випромінювання характеризується довжиною хвилі λ (нм, мкм) електромагнітних коливань, частотою ν (Гц) і енергією квантів світла (фотонів) E (Дж). Причому

$$E = h\nu = hc / \lambda,$$

де $h = 6.63 \cdot 10^{-34} \text{ Дж} \cdot \text{с}$ – стала Планка; $c = 3 \cdot 10^8 \text{ м/с}$ – швидкість світла.

Тут слід враховувати, що при переході з вакууму в речовину сталою залишається частота випромінювання, а довжина хвилі зменшується відносно величини у вакуумі в n (показник заломлення) разів:

$$\lambda = \lambda_0 / n.$$

А оскільки зручно характеризувати випромінювання і спектри поглинання через довжину хвилі, то в дослідженнях зазвичай використовують довжину хвилі, що відноситься до вакууму.

Величина $N_A h\nu = N_A hc / \lambda$ – кількість енергії 1 моля фотонів, називається 1 ейнштейном. Тут $N_A = 6.02 \cdot 10^{23} \text{ моль}^{-1}$. Хоча величина 1 ейнштейна змінюється і залежить від довжини хвилі світла, її зручно застосовувати для порівняння з тепловими ефектами фотохімічних реакцій. Наприклад, діапазон зміни 1 ейнштейна у видимому діапазоні випромі-

нювання ($380 \text{ нм} < \lambda < 760 \text{ нм}$) змінюється в інтервалі 158-315 кДж/моль.

Для опису поглинання і випромінювання світла застосовують наступні величини.

Потік випромінювання Φ (Вт) – енергія, що переноситься через деяку поверхню S в одиницю часу:

$$\Phi = dE / dt.$$

Інтенсивність світла ($\text{Вт}/\text{м}^2$) – густина потоку випромінювання, тобто потік, падаючий на одиницю площі, перпендикулярної до напрямку розповсюдження світла:

$$I = \Phi / S.$$

Доза випромінювання D ($\text{Дж}/\text{м}^2$) – експозиційна доза і дорівнює добутку інтенсивності на тривалість опромінювання.

1.3. Розсіяння і поглинання світла

Біологічні тканини є оптично неоднорідними поглинаючими середовищами з середнім показником заломлення більшим, ніж у повітря. Тому на межі розділу біооб'єкт-повітря (рис. 1.1) частина випромінювання відбивається (віддзеркалення Френеля), а решта частини проникає в біотканину.

Об'ємне розсіяння є причиною розповсюдження значної частки випромінювання у зворотному напрямі (зворотне розсіяння). Клітинні мембрани, ядра і органела (мітохондрії), гранули меланіну в клітках є основними розсіювачами для багатьох біотканин. Розміри окремих клітинних ядер можуть змінюватися залежно від рівня здоров'я клітки, що приводить до зміни характеру розсіяння тканини.

Спектр поглинання визначається типом домінуючих поглинаючих центрів і змістом води в біотканині.

Інтенсивність світла, що пройшла тонкий зразок тканини із значним поглинанням, в порівнянні з розсіянням, може бути оцінена на основі закону Бугера-Бера:

$$I(z) = (1 - R) I_0 \exp(-\mu_e z),$$

де $R = [(n - 1)/(n + 1)]^2$ – коефіцієнт френелевського віддзеркалення при нормальному падінні світлового пучка, n – відносний показник заломлення біотканини; I_0 – інтенсивність падаючого світла; $\mu_e = \mu_a + \mu_s$ – ко-

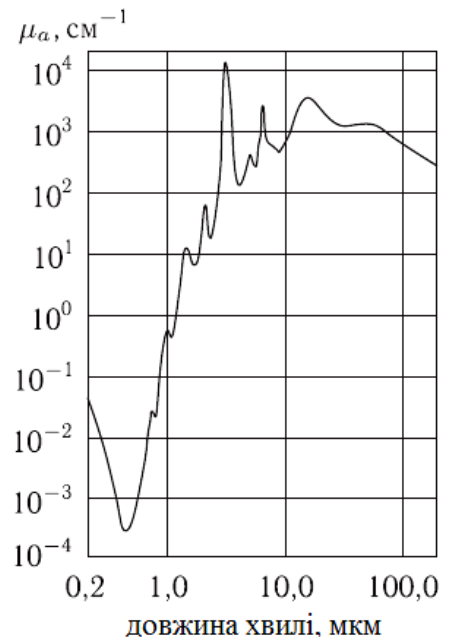


Рис.1.3. Спектр поглинання води

ефіцієнт екстинкції (ослаблення) μ_a – коефіцієнт поглинання (абсорбція) μ_s – коефіцієнт розсіювання, z – товщина зразка.

Середня довжина вільного пробігу одноразово розсіяного фотона в біотканині визначається як $l_{ph} = \mu_e^{-1}$. Це довжина, на якій відбувається падіння інтенсивності світла в e разів. Для біотканин абсолютні значення коефіцієнтів поглинання лежать в інтервалі від 10^{-2} до 10^4 см^{-1} .

В УФ і ІЧ ($\lambda \geq 2$ мкм) областях спектру переважає поглинання, тому внесок розсіювання порівняно малий і світло неглибоко проникає в біотканину. Для короткохвильової видимої області глибина проникнення типової біотканини складає 0.5-2.5 мм. В даному випадку має місце як поглинання, так і розсіювання. Тому близько 15-40% падаючого випромінювання відбивається на цих довжинах хвиль.

Розсіювання декілька зменшується зі збільшенням довжини хвилі¹, але при цьому поглинання зменшується істотніше, так що розсіювання преважує над поглинанням, а, отже, глибина проникнення світла збільшується.

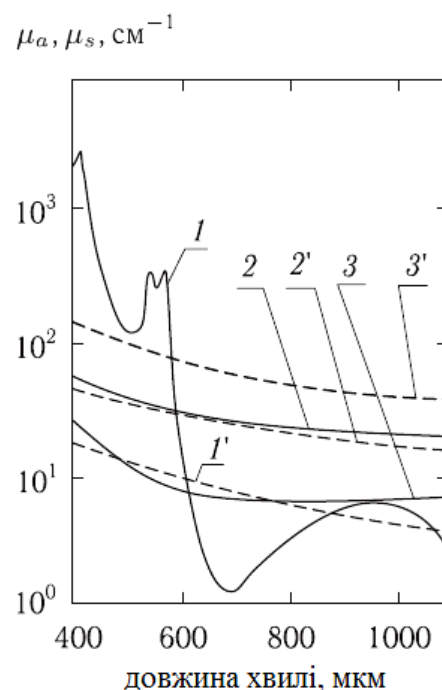


Рис. 1.4. Спектральні залежності для коефіцієнтів поглинання μ_a і розсіювання μ_s крові (1, 1'), епідермісу (2, 2') і дерми (3, 3')

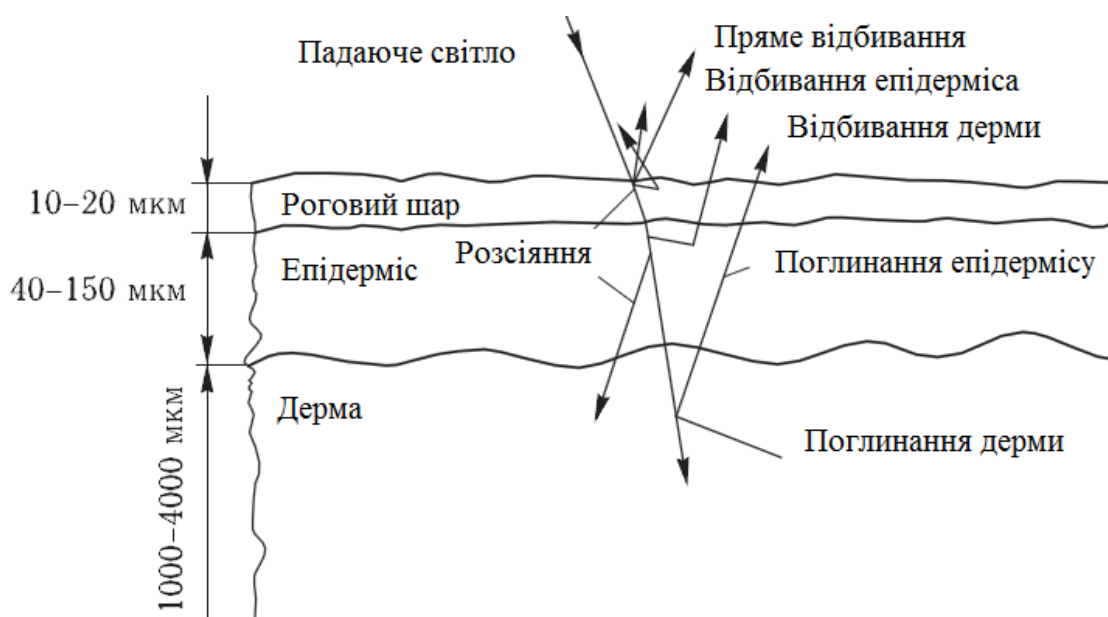


Рис. 1.5. Взаємодія світла зі шкірою

¹ Наприклад, при розсіянні світла в повітрі справедливий закон Релея: інтенсивність розсіяного світла обернено пропорційна 4 степені довжини хвилі $I_{роз} \sim \lambda^{-4}$.

ся до 8-10 мм в області довжин хвиль 600-1600 нм. Також істотно збільшується інтенсивність відбитого біотканиною випромінювання (за рахунок зворотного розсіювання), аж до 35-70%.

Із-за багат шаровості і багатокомпонентності тканин, взаємодія зі світлом виявляється вельми складною. Наприклад, при потраплянні світла на шкіру роговий шар відображає близько 5-7% падаючого світла. Колімаований промінь світла перетвориться в дифузійний із-за мікроскопічних неоднорідностей на межі повітря – роговий шар. Велика частина відбитого шкірою світла утворюється за рахунок зворотного розсіювання різними шарами тканини (роговий шар, епідерміс, дерма і мікросудинна система).

При аналізі розповсюдження світла в біотканинах з багатократним розсіюванням припускають зазвичай рівномірний розподіл поглинаючих і розсіюючих центрів. Для УФА, видимого і ближнього ІЧ випромінювання типовим є анізотропне розсіювання фотонів, що пов'язане з присутністю великої клітинної органели, таких як мітохондрії, лізосоми, внутрішні мембрани (апарат Гольджі).

1.4. Поглинання монохроматичного світла

Розглянемо кювету з розчином досліджуваної речовини, на яку падає пучок монохроматичного світла з інтенсивністю I_0 . Якщо в зразку відбувається поглинання світла, то в результаті інтенсивність світла ослабиться до величини I . Відношення цих величин називають **пропусканням** $T = I/I_0$. Величину $1 - T = (I_0 - I)/I_0$ називають **коефіцієнтом поглинання**.

Виділимо в об'ємі зразка тонкий перетин товщиною dl , перпендикулярне напрямку I_0 . Якщо концентрація молекул, що поглинають світло, рівна $n(\text{м}^{-3})$, а $s(\text{м}^2)$ їх поперечний перетин поглинання, при попаданні в яке відбувається поглинання фотона, то ослаблення інтенсивності світла шаром dl рівне:

$$dI' / I' = -s n dl .$$

Після інтегрування по всій довжині шару отримаємо закон Бугера-Ламберта-Бера:

$$I / I_0 = T = \exp(-s n l) .$$

Таким чином, коефіцієнт поглинання і пропускання світла залежать від концентрації молекул і товщини зразка. Для зручності використовують поняття **оптичної густини**² зразка D :

$$-\lg(I / I_0) = -\lg T = \epsilon c l = D .$$

Тут c – молярна концентрація (моль/м³), ϵ – молярний коефіцієнт

² В англійській літературі використовується позначення A від слова absorbance – поглинання

поглинання ($\text{м}^3/(\text{моль} \cdot \text{м})$), пов'язана з s співвідношенням $\varepsilon = \lg e \cdot N_A \cdot s$.

Використання поняття оптичної густини має сенс, бо на відміну від безпосередньо вимірюваного в експерименті пропускання T і коефіцієнта поглинання $1 - T$ оптична густина D є величина **адитивна**. Тобто оптична густина послідовно розташованих елементів дорівнює сумі оптичних густин кожного з них:

$$D_{\Sigma} = \sum D_i.$$

Оскільки гомогенний розчин суміші декількох речовин можна представити як чергування нескінченне тонких шарів розчинів кожного їх цих речовин окремо, то адитивність оптичної густини застосовна і до розчинів суміші речовин: оптична густина суміші дорівнює сумі оптичних густин всіх окремих компонентів.

Закон Бугера-Ламберта-Бера виконується не завжди. Причини відхилень можуть бути наступними:

1. Закон виводиться в припущенні, що хромофори (молекули, що поглинають світло), розподілені в розчині рівномірно. Якщо розподіл нерівномірний, то це приводить до заниження оптичної густини внаслідок ефекту сит.

2. Вважається, що ε є константою і не залежить від концентрації. Якщо при підвищенні концентрації характер взаємодії між хромофорами змінюється (агрегація або розпад молекул), то фотофізичні властивості молекул, а також ε , змінюється.

3. Залежність D від s може відхилятися від лінійної при використанні немонохроматичного світла.

4. У розчині під дією світла не повинні скільки-небудь помітно протікати фотохімічні перетворення хромофорів.

5. Інтенсивність вимірюючого світлового пучка повинна бути достатньо низка, щоб в результаті поглинання світла концентрація незбуджених молекул практично не зменшувалася в ході вимірювання.

6. Якщо відбувається в зразку також і розсіювання світла, то оптична густина підвищується.

7. Люмінесценція заважає точному вимірюванню оптичної густини D . Якщо фотони люмінесценції потраплятимуть на фотодетектор, то це приведе до заниження D .

Ці відхилення можуть, з одного боку служити перешкодою при кількісному аналізі, з іншої – давати додаткову інформацію про властивості досліджуваних об'єктів.

Сильна анізотропія розсіювання біотканин і багатократний його характер приводять до відхилення характеру пропускання світла від закону Бугера-Бера. Крім того, для багатьох тканин (шкіра, сітківка ока, кров) характерна і неоднорідність поглинання. Наприклад, значення коефіціє-

нта поглинання меланінових гранул сітківки ока в 10 разів більше, ніж навколишньої тканини, а розподіл нерівномірний.

1.5. Ефект багатократного розсіяння

В результаті світлорозсіяння відбувається відхилення вимірюючого світлового пучка від первинного напрямку, внаслідок чого не все пройдене світло потрапляє на фотоприймач. Це приводить до завищення вимірюваної оптичної густини. Для боротьби з **ефектом світлорозсіяння** використовують спектрофотометри, забезпечені світловимірювальною кулею (інтегруючою сферою Ульбріхта). В цьому випадку практично все розсіяне зразком світло потрапляє на фотоприймач, і вимірювана оптична густина обумовлена тільки дійсним поглинанням.

У деяких приладах для боротьби з ефектом світлорозсіювання відразу за кюветами розташовують світлорозсіювальні пластинки, а фотодетектор максимально наближають до кювет. Фактично розсіююча пластинка нівелює різницю між каламутними і прозорими зразками. Річ у тому, що велика частина світу, розсіяного частинками в суспензії, направлена вперед і потрапляє на пластинку. Фотодетектор вимірює світло, розсіяне пластинкою, а не зразком. Таким чином, інтенсивність реєстрованого світла мало залежить від того, розсіює зразок світло чи ні.

Проте далеко не всі прилади пристосовані для автоматичного обліку впливу світлорозсіяння. В таких випадках вводять поправки.

Ефект багатократного відбиття і розсіяння світла на частинках. Поглинання і розсіяння світла можна вважати незалежними процесами, тобто вимірювана оптична густина D є сума оптичної густини, обумовленою світлорозсіянням D_s і оптичної густини, обумовленої дійсним поглинанням D_a :

$$D = D_s + D_a.$$

Щоб знайти $D_a = f(\lambda)$ потрібно знати залежність D_s від довжини хвилі. Відомо, що для суспензії частинок у відсутності поглинання

$$D_s = \beta / \lambda^n,$$

де β і n – константи, які залежать від форми і розмірів частинок. n може мати значення від 0 до 4.

Прологарифмувавши рівняння для D_s отримаємо

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

де $\lg D_s$ – лінійна функція $\lg \lambda$.

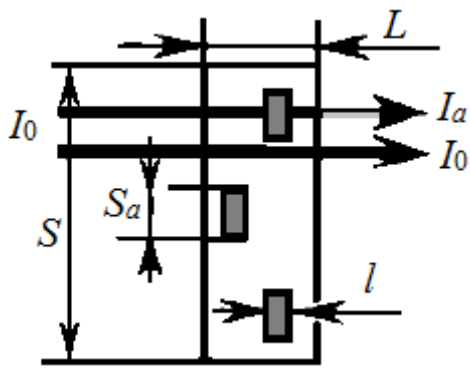
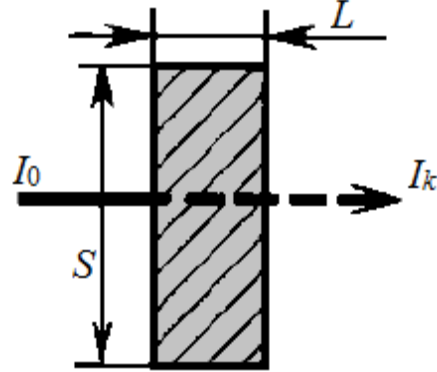
На графіці залежності $\lg D = f(\lg \lambda)$ у довгохвильовій області спектру, де поглинання відсутнє ($D_a = 0$), повинна вийти пряма лінія. Екстраполювавши її, можна знайти величину $\lg D_s$ і, отже D_s у всьому вимі-

ряному спектральному інтервалі. На останок розраховуємо $D_a = D - D_s$ і будуємо дійсний спектр поглинання $D_a = f(\lambda)$.

1.6. Ефект сит

В суспензії еритроцитів нерівномірно розподілений гемоглобін. Тому поглинання світла суспензією забарвлених частинок (еритроцитів) відрізняється від поглинання світла розчином забарвленої речовини (наприклад, розчином гемоглобіну, що вийшов з еритроцитів при гемолизі). Цю відмінність в поглинанні пояснюють *ефектом сита*.

Таблиця. 1.2. Пропускання світла суспензією і розчином

	Суспензія	Розчин
Потік світла		
Падаючий	$I_0 S$	$I_0 S$
Пройдений	$I_a S_a + I_0 (S - S_a)$	$I_k S$

При проходженні пучка світла інтенсивністю I_0 через об'єкт, в якому забарвлена речовина розподілена нерівномірно, ослаблення пучка буде різним в тих місцях, де світло проходить через забарвлені частинки I_a і I_0 , і там, де він їх мине (табл. 1.2). Якщо сумарна площа перетину частинок рівна S_a , а площа всього зразка S , то пропускання такого зразка T і оптична густина D рівні

$$T = \frac{I_a S_a + I_0 (S - S_a)}{I_0 S} = \frac{S_a}{S} (T_a - 1) + 1 \quad \text{і} \quad D = -\lg T. \quad (1.4.1)$$

Тут передбачається, що концентрація частинок невисока і при проходженні променя світла через зразок йому зустрічається максимум одна частинка.

Пропускання гомогенного розчину такої ж кількості забарвленої речовини, але розчиненого у всьому об'ємі SL (L – товщина зразка):

$$T_k = \frac{I_k}{I_0}. \quad (1.4.2)$$

Введемо c_a і c – концентрації речовини в частинках і гомогенному розчині і врахуємо, що кількість забарвленої речовини однакова в обох

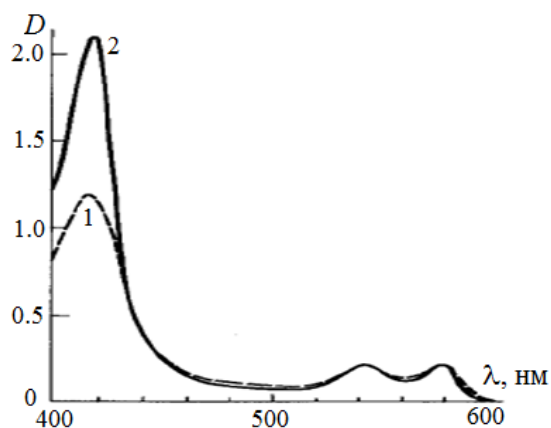


Рис. 1.6. Ефект сита в суспензії еритроцитів: 1 – спектр поглинання суспензії еритроцитів; 2 – той же зразок після гемолізу.

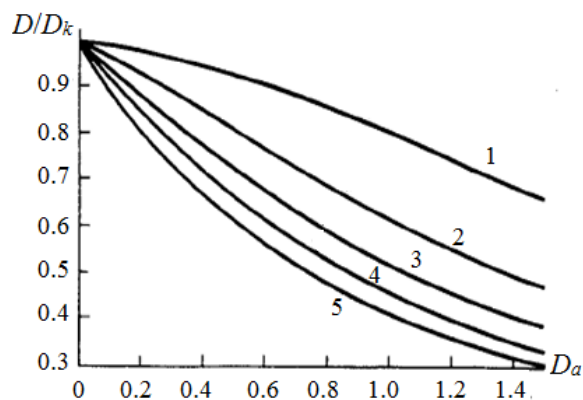


Рис. 1.7. Залежність ефекту сита від нерівномірності розподілу поглинання речовини S_a/S і оптичної густини частинок D_a : відношення S_a/S складає: 1 – 0.9, 2 – 0.7, 3 – 0.5, 4 – 0.3, 5 – 0.1.

випадках рівна $c_a S_a l = c S L$. Тоді помноживши останню рівність на ε отримаємо:

$$D_a S_a = D_k S,$$

де D_a і D_k – оптична густина частинок і однорідного розчину, відповідно.

Оптична густина D неоднорідного зразка може бути розрахована, якщо відомі відношення S_a/S і одна з величин:

$$D_a = -\lg T_a \quad \text{або} \quad D_k = -\lg T_k. \quad (1.4.3)$$

Сумісне рішення (1.4.1) – (1.4.3) дозволяє визначити відношення D/D_k , яке характеризує ефект сит.

На рис. 1.12 приведені залежності D/D_k від D_a при різних значеннях S_a/S . Видно, що ефект сита позначається тим сильніше, чим більше нерівномірність розподілу поглинаючої речовини (тобто S_a/S) і чим вище оптична щільність частинок (тобто D_a).

Приклад. Оцінимо оптичну густину для еритроцитів в суспензії. Еритроцитами є плоскі диски діаметром 8 і товщиною 2 мкм. Гемоглобін (відносна молярна маса $M_r = 68\,000$) складає ~30% маси еритроцитів. Молярні коефіцієнти поглинання оксигемоглобіну рівні $\varepsilon_{540} = 1.5 \cdot 10^4$ і $\varepsilon_{418} = 1.2 \cdot 10^5$ л/(моль·см). Молярна концентрація гемоглобіну в еритроцитах $c = 4.5 \cdot 10^{-3}$ моль/л.

Якщо еритроцит розташований плоскою стороною перпендикулярно до променя, то згідно із законом Бугера-Ламберта-Бера $D_{540} = 0.014$ ($T_{540} = 97\%$) і $D_{418} = 0.11$ ($T_{418} = 77\%$).

Якщо еритроцит повернений плоскою стороною паралельно проме-

ню світла, то $D_{540} = 0.056$ ($T_{540} = 88\%$), а $D_{418} = 0.44$ ($T_{418} = 36\%$).

Таким чином, залежно від орієнтації еритроцити пропускають в максимумі поглинання 418 нм всього 36 – 77% світла, а в максимумі 540 нм – 88 – 97%. З цих даних видно, що в синьої області спектру (у смузі Соре) еритроцит поглинає значну частку падаючого на нього світлового потоку. В результаті оптична густина суспензії виявляється нижчою, ніж оптична густина розчину оксигемоглобіну, що має місце лише в області ~418 нм, де D_a велика.

Таким чином, і багатократне світлорозсіювання, і ефект сита приводять до згладжування спектрів поглинання. У максимумах, де сильніше позначається ефект сита, оптична густина знижується, а мінімумами за рахунок багатократного розсіювання підвищуються.

1.7. Спектр поглинання

Кожна молекула має серію заповнених і вільних електронних орбіталей. Поглинання кванта світла приводить до переходу електрона на орбіталь з більшою енергією. Молекула при цьому переходить на вищий енергетичний рівень. Зворотний перехід може супроводжуватися випусканням кванта люмінесценції. Енергія поглиненого або випущеного кванта дорівнює різниці енергії між рівнями

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

Залежність оптичної густини D якого-небудь об'єкту (розчину, тканини) від довжини хвилі λ світла називають **спектром поглинання** даного об'єкту.

Спектр розчину індивідуальної сполуки прийнято нормувати до одиничної концентрації і довжини кювети, що рівносильне залежності молярного коефіцієнта поглинання ϵ від довжини хвилі λ .

Атоми і прості молекули в газовій фазі мають лінійчаті спектри поглинання. Для біологічних речовин спектрами є плавні криві з декількома максимумами.

Це пояснюється впливом **мікрооточення молекули**. Для молекул характерна наявність не тільки електронних рівнів, але і обертальних і коливальних підрівнів, енергії яких квантовані. Внутрішня енергія молекули дорівнює сумі енергій: електронів, коливань ядер в молекулі і обертальних рухів. Енергії коливальних і обертальних переходів, пов'язаних з тепловими рухами молекули, порівняно з енергією електронних переходів малі. Для коливальних переходів енергія має порядок 0.1 еВ, для обертальних ще менше – 0.01 еВ, їх енергетичний бар'єр долається тепловою дією дуже довгохвильових квантів, що не належать видимій області спектру (рис. 1.8).

Таким чином енергії переходів повинні бути квантовані.

Зв'язок між електронними переходами і зміною коливальній енергії

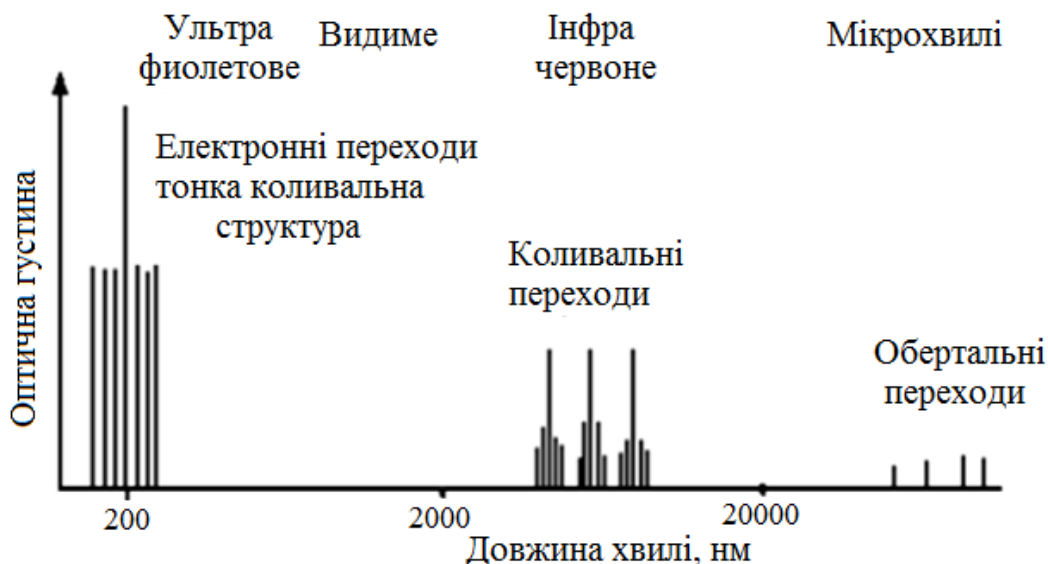


Рис. 1.8. Ідеалізований спектр поглинання

в молекулах зручно розглядати, використовуючи графік залежності потенційної енергії молекули в основному і збудженому станах від між'ядерних відстаней (рис. 1.9а).

Всі електронні переходи відбуваються без зміни між'ядерної відстані. Електронні переходи є настільки швидкими ($10^{-14} - 10^{-15}$ с) в порівнянні з рухом ядер в молекулі ($10^{-12} - 10^{-13}$ с), що за час електронного переходу відносно розташування ядер і їх кінетична енергія не змінюються (*принцип Франка-Кондона*). Тому зручно представляти електронні і коливальні рівні у вигляді характерних зон (рис. 1.9b).

У розчині і біологічних системах дана біологічна молекула оточена декількома полярними молекулами середовища. Їх дипольні моменти створюють локальні електричні поля, дія яких приводить до зміни енергій електронних переходів. Ці зміни ΔE залежать не тільки від відстані

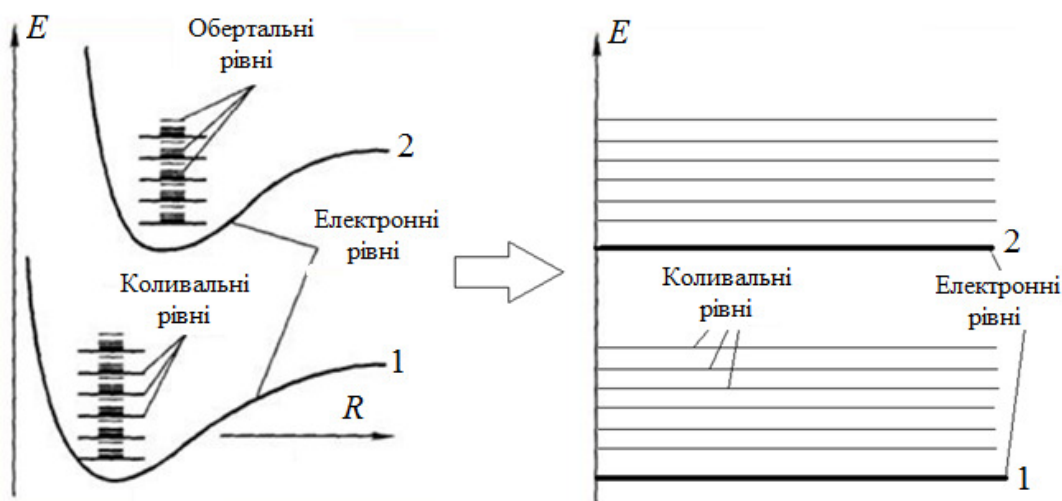


Рис. 1.9. Трансформація спектра поглинання

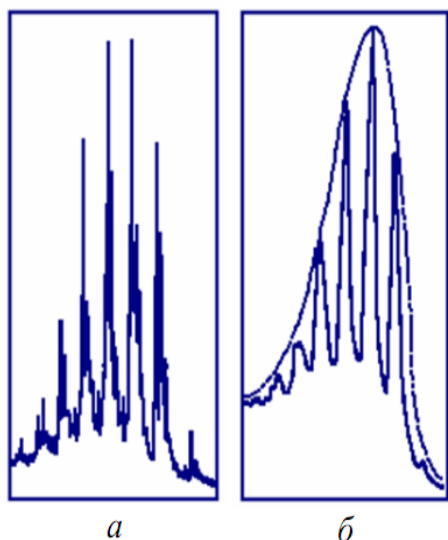


Рис. 1.10. Спектри поглинання: а – парів бензину; б – розчина бензину в спирті

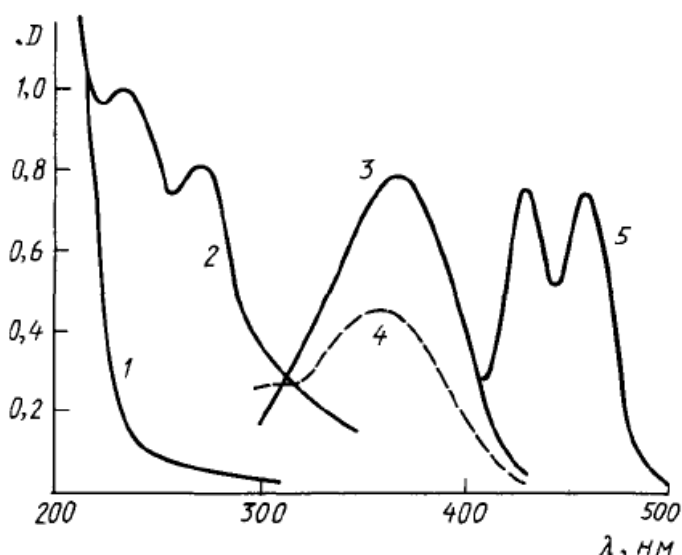


Рис. 1.11. Залежність положення довгохвильового максимуму поглинання від числа пов'язаних подвійних зв'язків (N) в молекулі: 1 – фосфоліпіди, виділені з мозку ($N=1$); 2 – окислені фосфоліпіди: дієнові кон'югати $\lambda_{\text{max}} = 233\text{nm}$, ($N=2$), триєнові кон'югати $\lambda_{\text{max}} = 270\text{--}280\text{ nm}$ ($N=3$) і частково карбонільні сполуки; 3 – повністю транс-ретиналь ($N=6$); 4 – *11-цис-ретиналь* ($N=6$); 5 – каротиноїди ($N=11$)

між молекулами, але і від їх взаємної орієнтації. Оскільки ΔE не квантуються, то енергії електронних переходів можуть набувати будь-яких значень близьких до енергії переходу у відсутності впливу мікрооточення.

Суперпозиція величезного числа зміщених смуг поглинання приводить до появи плавної кривої поглинання розчину в цілому. А максимум на кривій відповідає найбільш вірогідній усередненій величині енергії переходу (рис. 1.10).

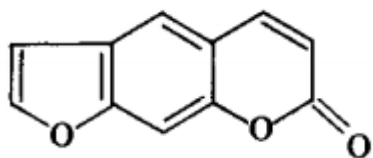
Аналізуючи спектри біологічних молекул (рис. 1.11) видно, що чим більше в молекулі число зв'язаних подвійних зв'язків, тим більше довжина хвилі максимуму поглинання даної речовини. Так молекули пероксидів жирних кислот містять два зв'язаних подвійних зв'язки (розділені одним простим зв'язком) з максимумом поглинання при 233 нм. Продукти пероксидного окислення ліпідів мають три зв'язаних подвійних зв'язки і максимум поглинання 260-280 нм. Молекули ретиналя містять 6 зв'язаних подвійних зв'язків і максимум поглинання 360 нм.

Приблизно цю величину можна визначити по наступній формулі:

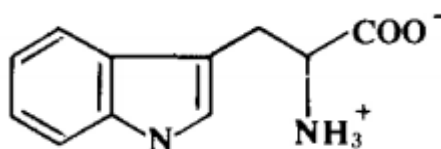
$$\lambda \approx \frac{4mcl^2}{h} N,$$

де m – маса електрона, c – швидкість світла, l – довжина одного елементу ланцюга зв'язаних подвійних зв'язків; h – стала Планка.

Молекули більшості речовин, що поглинають світло у видимій і ближній ультрафіолетовій областях спектру, мають в складі і гетероатоми: атоми кисню в молекулі псоралену або азоту в індольному кільці триптофану:



псорален



триптофан

Енергія верхніх заповнених електронів таких гетероатомів (n -орбіталі) значно перевищує не тільки енергію σ -електронів (створюючі одинарні зв'язки між атомами – σ -орбіталі), але часто перевищують і енергію заповнених орбіталей зв'язаних подвійних зв'язків (π -орбіталей) (рис. 1.12). n -електрон – це неспарений p -електрон, який не створює хімічний зв'язок, але здатний переходити на збуджений рівень π^* -орбіталі. Довжина хвилі $n \rightarrow \pi^*$ переходу може бути більше довжини $\pi \rightarrow \pi^*$ переходу в тій же молекулі. Перехід виявляється у вигляді довгохвильового плеча на основній смужі поглинання, оскільки молярний коефіцієнт $n \rightarrow \pi^*$ поглинання невеликий.

В ультрафіолетовій і видимій області спектру інтенсивно поглинають хімічні сполуки, що мають в своєму складі зв'язані подвійні зв'язки і кільцеві групи, що володіють π -електронною системою.

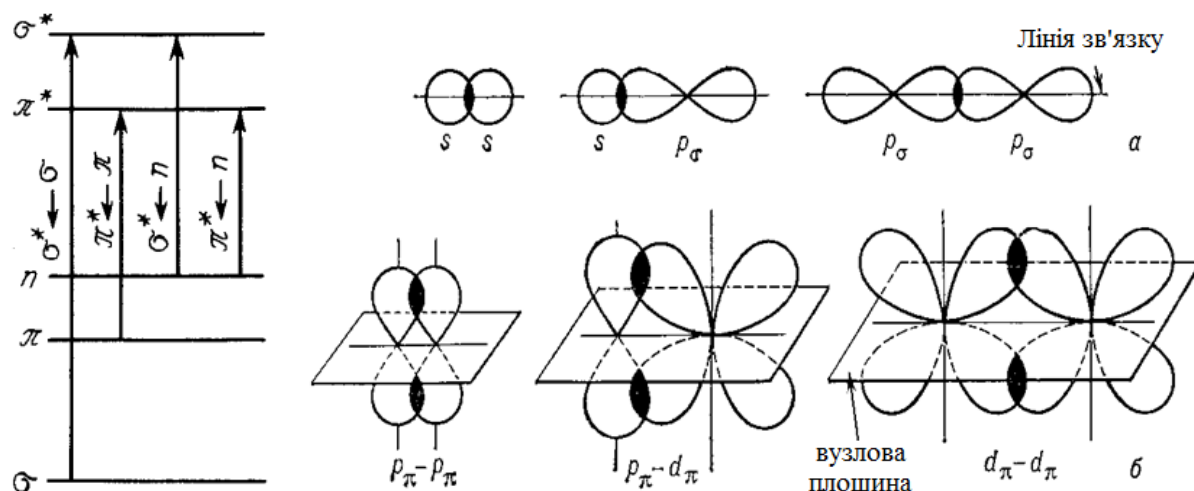


Рис. 1.12. Електронні переходи різних типів, 2) схематичне зображення просторової орієнтації орбіталей при утворенні σ -зв'язків в результаті $s-s$, $s-p$, $p-p$ взаємодій (а) і π -зв'язки в результаті $p-p$, $p-d$, $d-d$ взаємодій (б).

1.8. Аналіз спектрофотометрії

Спектри поглинання розчинів, суспензій і тканин отримують за допомогою спектрофотометрів, які можна конструктивно розділити на однопроменеві та двопробні.

У однопроменевому спектрофотометрі світло від джерела (частіше використовують ксенонові лампи, що дають суцільний спектр випромінювання у видимій і ультрафіолетовій областях) проходить через монохроматор. Монохроматичний пучок світла проходить через кювету із зразком, і його інтенсивність пройденого світла вимірюють приймачем світла. Після проходження сигнал записується. У сучасних однопроменевих спектрофотометрах (рис. 1.13а) спочатку записують при всіх довжинах хвиль інтенсивність світла, що пройшло, через контрольну кювету, заповнену розчинником $I_0 = f(\lambda)$. У перетворювачі, де використовується мікропроцесор, сигнали I_0 запам'ятовуються. Він і вважається нульовою лінією, що показує, що оптична густина зразка береться за нуль. Потім ставлять кювету з випробовуваним розчином і вимірюють інтенсивність світла, що проходить $I = f(\lambda)$.

У перетворюючому пристрої відбувається розрахунок при різних довжинах хвиль або пропускання $T = I / I_0$ або оптичної густини.

У двопробних спектрофотометрах (рис. 1.13б) монохроматичний пучок світла розщеплюється на два за допомогою дзеркала, що обертається, з секторними вирізами (обтюратор О). Ці два однакових по інтенсивності пучки проходять через дві кювети з розчинами, один з яких служить як контрольний. Фотоприймач вимірює сигнали, що поперемінно поступають до нього на вихід з кювет. Після підсилення ці сигнали

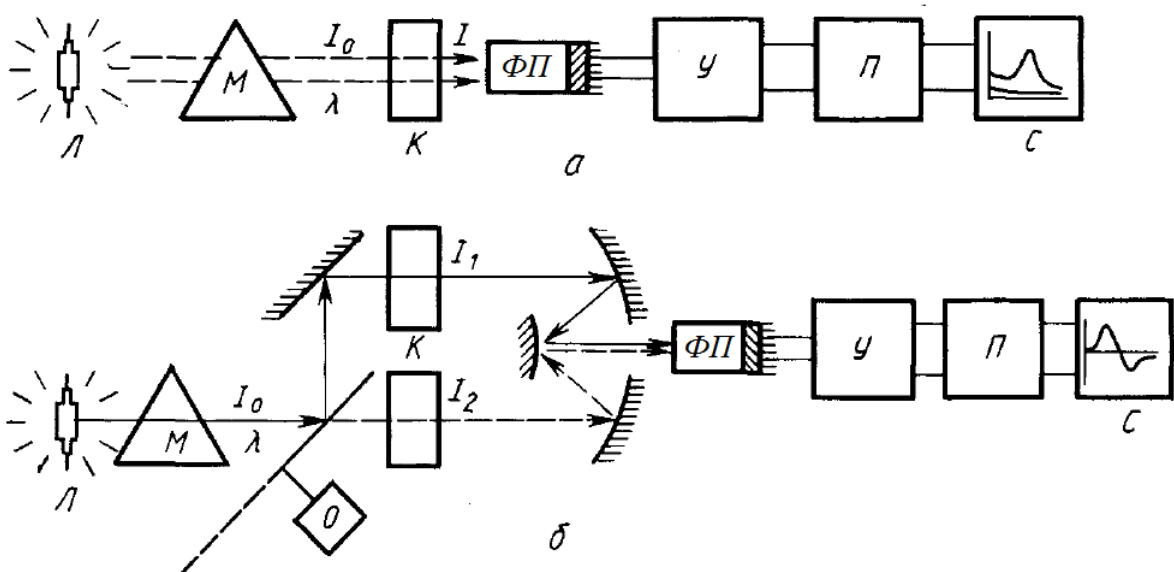


Рис. 1.13. Блок-схеми однопроменевого (а) і двопробного (б) спектрофотометрів: Л – лампа, М – монохроматор, К – кювета, О – обтюратор, ФП – фотоприймач, У – підсилювач, П – мікроконтролер-перетворювач, С – сигнал

ли перетворюються у відношення світлових потоків $I_1 / I_2 = \Delta T$ і потім в $\Delta D = -\lg(\Delta T)$. Крива $\Delta D = f(\lambda)$ є результатом.

Двопроменевий спектрофотометр спеціально призначений для запису різницевих спектрів. На ній можна записувати і звичайні спектри поглинання, якщо за зразок порівняння взяти кювету з розчинником. Диференціальні спектрофотометри на відміну від однопроменевих чутливіші і дозволяють вимірювати різницю в оптичній густині зразків до 10^{-4} при базовій оптичній густині до 2.

На результати вимірювання спектрів може впливати:

- нестабільність світлового випромінювання ламп;
- чутливість фотоприймача і електронної системи підсилення фотоструму;
- монохроматор виділяє не точно монохроматичне світло, а малий інтервал довжин хвиль (ширина щілини не нескінченно мала);
- в пройденому світлі можуть бути присутніми «домішки» світла – фотонів інших довжин хвиль за рахунок багатократного віддзеркалення всередині приладу.

Якісний аналіз спектрофотометрії заснований на тому, що кожна сполука має характерний для неї спектр поглинання.

Для ідентифікації речовини найбільш важливі:

- 1) число максимумів в спектрі поглинання;
- 2) положення (довжина хвилі) кожного максимуму;
- 3) значення коефіцієнтів поглинання ϵ в кожному з максимумів;
- 4) відношення амплітуд максимумів (тобто відношення коефіцієнтів поглинання в максимумах), якщо їх декілька.

Складність спектру поглинання залежить від того, якому числу електронних переходів між різними рівнями відповідає даний спектр. Вважається, що кожен електронний перехід дає смугу поглинання, яка на графіці представлена кривою, близькою до гаусової кривої нормального розподілу.

Кількісний аналіз спектрофотометрії заснований на застосуванні закону Бугера-Ламберта-Бера. Так можна одночасно визначати концентрацію декількох речовин, якщо спектри їх поглинання розрізняються формою. Сумарний спектр поглинання суміші декількох речовин є проста сума спектрів поглинання компонентів.

Якщо відомі молярні коефіцієнти поглинання для обох речовин ϵ_1 і ϵ_2 , товщина кювет l , то для знаходження невідомих концентрацій c_1 і c_2 необхідно визначити оптичну густину суміші D на двох довжинах хвиль. В результаті отримують систему з двох рівнянь з двома невідомими

$$\begin{cases} D(\lambda_1) = \varepsilon_1(\lambda_1)c_1l + \varepsilon_2(\lambda_1)c_2l, \\ D(\lambda_2) = \varepsilon_1(\lambda_2)c_1l + \varepsilon_2(\lambda_2)c_2l, \end{cases}$$

вирішивши яку, знаходять обидві концентрації.

Вибрані дві довжини хвилі λ_1 і λ_2 повинні бути такими, для яких молярні коефіцієнти поглинання компонентів розрізняються більше всього. Це не завжди відповідає максимумам в спектрі поглинання речовин.

Теоретично, якщо число довжин хвиль, використовуваних для вимірювань, дорівнює числу компонентів в суміші, можна проаналізувати і складніші суміші. На практиці ж рідко вдається здійснити кількісний аналіз спектрофотометрії більше 2 – 3 з'єднань в одній суміші.

Найменша похибка у визначенні концентрації виходить при оптичній густині розчину від 0.2 до 0.8 ($T = 15-65\%$).

Є декілька способів, що дозволяють добитися максимальної точності аналізу спектрофотометрії:

- а) розбавлення розчину;
- б) зменшення товщини зразка;
- в) підбір довжини хвилі фотометрії, при якій забезпечується потрапляння вимірюваних величин оптичної густини в оптимальні межі.

Розділ 2. ФОТОЛЮМІНЕСЦЕНЦІЯ БІОЛОГІЧНИХ СИСТЕМ

2.1. Флуоресценція

При поглинанні фотона електрон переходить на одну з вільних орбіталей (або на новий енергетичний рівень) і молекула виявляється у збудженому стані. Таких рівнів може бути декілька, і молекула може опинитися на будь-якому з них, залежно від того, якою була довжина хвилі поглинутого випромінювання (рис. 2.1).

Зворотний перехід на основну орбіталь приводить до зменшення енергії системи, яка може виділитися по частинах, розтратившись на коливальні рухи ядер і поступальну ходу молекул розчинника, тобто теплоту, або ж ця енергія збудженого стану може виділитися однією порцією у вигляді кванта люмінесценції.

Люмінесценцією тіла в даній спектральній області називають надлишок випромінювання над температурним за умови, що це надмірне випромінювання володіє кінцевою тривалістю, що перевищує період світлових коливань.

Утворення електронно-збуджених молекул може бути не тільки результатом поглинання ними квантів світла, але і наслідком хімічних реакцій, електричного розряду та ін.

Тому в залежності від джерела енергії при збудженні молекул говорять про різні типи люмінесценції:

- **фотолюмінесценція**, що виникає в результаті освітлення молекул;
- **хемілюмінесценція** – світіння, супроводжує хімічні реакції;
- **біолюмінесценція** – світіння в результаті біохімічних реакцій;
- **термолюмінесценція** – світіння при нагріванні зразка;
- **електролюмінесценція** – світіння при пропусканні електричного струму;
- **сонолюмінесценція** – світіння в результаті дії ультразвуку;
- **триболюмінесценція** – світіння в результаті тертя поверхонь.

У початковому (незбудженому) стані молекули знаходяться на самому нижньому з можливих енергетичних рівнів (рис. 2.1), тобто на нижньому коливальному підрівні основного стану S_0 . У органічних молекул, що мають систему зв'язаних подвійних зв'язків, це стан синглетний, при якому спіни електронів на верхній заповненій орбіталі антипаралельні (S_0). Ймовірність самовільного переходу молекули на вищий енергетичний рівень за рахунок теплової енергії молекул визначається рівнянням Больцмана:

$$n = n_0 \exp\left(-\frac{\Delta E}{kT}\right).$$

де n_0 і n – число молекул в основному і збудженому станах; ΔE – різни-

ця енергій рівнів; k – стала Больцмана; T – абсолютна температура.

Наприклад, для найближчих коливальних підрівнів $\Delta E = 0.1$ eV (при 300 K $0.1\text{eV} \approx 4kT$). Звідси знаходимо, що $n/n_0 = 0.018 = 1.8\%$. Заселеність вищерозміщених електронних рівнів ще нижча, оскільки ΔE між рівнями більше. Таким чином, в стані теплової рівноваги з навколишнім середовищем практично всі молекули знаходяться на самому нижньому коливальному підрівні самого нижнього електронного рівня.

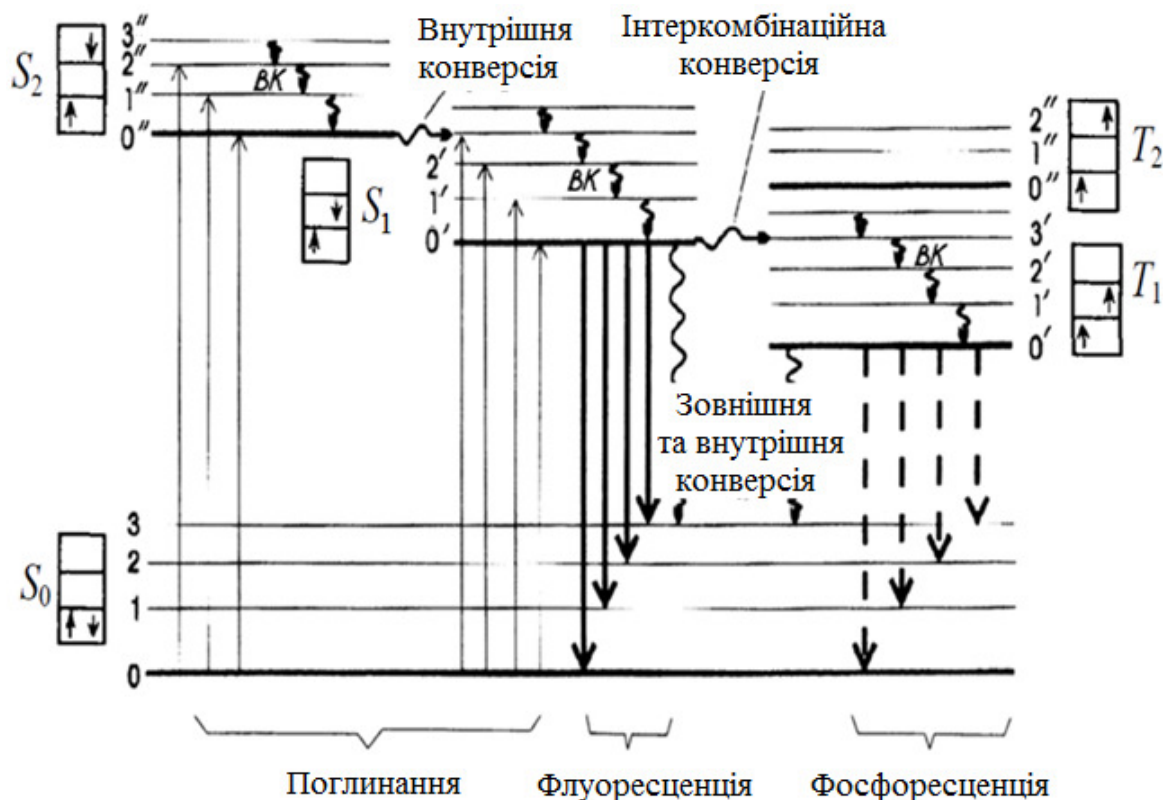


Рис. 2.1. Електронні переходи в біомолекулах: S_0 – основний (незбуджений) стан. S_1 , S_2 , T_1 , T_2 – збуджені, відповідно, синглетні і триплетні стани; біля кожного рівня показаний напрям спіну збудженого електрона по відношенню до спіну електрону, що залишився; жирні горизонтальні лінії – чисто електронні рівні енергії, тонкі (0, 1, 2 ... чи 0', 1', 2'...) – коливальні рівні; тонкі прямі стрілки – поглинальні переходи, товсті прямі і пунктирні – випромінювальні переходи, хвилясті – безвипромінювальні переходи; ВК – внутрішня конверсія (переходи електрона без обернення спіну); ІК – інтеркомбінаційна конверсія (переходи електрона з оберненням спіну)

Характерний час процесів	
Поглинання	10^{-15} с
Коливальна релаксація	$10^{-12} - 10^{-10}$ с
Час життя збудженого стану S_1 (флуоресценція)	$10^{-10} - 10^{-7}$ с
Інтеркомбінаційна конверсія	$10^{-10} - 10^{-8}$ с
Внутрішня конверсія	$10^{-11} - 10^{-10}$ с
Час життя збудженого стану T_1 (фосфоресценція)	$10^{-6} - 10$ с

З основного стану S_0 молекула може перейти на різні коливальні підрівні вищерозміщених електронних орбіталей (електронних рівнів збудженого стану) S_1 , S_2 і т. д., поглинувши фотони відповідної енергії. Таким чином, довжина стрілок вгору (рис. 2.1) дозволяє знайти частоти і довжини хвиль максимумів тонкої структури спектрів поглинання молекул. Зазвичай доводиться вирішувати зворотну задачу: знаючи структуру спектру поглинання, будувати схему електронних рівнів (якщо спектр достатньо дозволений – то і коливальних підрівнів) молекул у збудженому стані.

Поглинання фотона відбувається за час порядку 10^{-15} с, протягом наступних 10^{-12} с встановлюється теплова рівновага збудженої молекули з навколишнім середовищем. В стані рівноваги відносна заселеність підрівнів у збудженому стані, як і в основному, визначається рівнянням Больцмана (2.1). Тому фактично за 10^{-11} з відбувається розтрата частини енергії збудженого стану на тепловий рух навколишніх молекул (дисипація частини енергії фотона в теплоту). На рис. 2.1 це відповідає переходу ВК з різних коливальних підрівнів на нижній коливальний підрівень нижнього зі збуджених станів.

У люмінесцентних молекулах збуджений (синглетний) стан відносний стійкий: електрон може знаходитися на орбіталі у збудженому стані до 10^{-9} – 10^{-8} с.

У відсутності переносу енергії на інші молекули і фотохімічної реакції зворотний перехід збудженої молекули в основний стан може відбуватися трьома шляхами.

1. Електрон переходить з орбіталі збудженого стану S_1 на орбіталь основного стану S_0 , при цьому висвічується квант світла флуоресценції. Оскільки такий перехід може відбуватися на різні коливальні підрівні основного стану, то в спектрі флуоресценції можлива тонка структура, яка розмивається в полярних розчинниках.

2. Енергія збудженого стану поступово розтрачується на теплові рухи молекул. Квант світла при електронному переході зі збудженого рівня на основний не висвічується (перехід ВК з рівня S_1 на рівень S_0). Такий електронний перехід називають безвипромінювальним.

3. Відбувається обернення спіну електрона на орбіталі S_1 . Молекула переходить в триплетний стан T_1 , енергія якого декілька нижче за енергію синглетного. Оскільки прямий перехід з триплетного стану в основний синглетний заборонений, тобто малоімовірний, молекула може знаходитися в триплетному стані порівняно тривалий час від 10^{-4} с до декількох секунд. При звичайних температурах в рідкій фазі за цей час відбувається теплова дисипація енергії збудженого триплетного стану – безвипромінювальний перехід в основний стан $T_1 \rightarrow S_0$. Але в розчинах, заморожених рідким азотом, і навіть при кімнатних температурах, але в

твердих зразках, може спостерігатися випромінювальний перехід $T_1 \rightarrow S_0$, що супроводжується випромінюванням кванта фосфоресценції.

Спектром люмінесценції (флуоресценції або фосфоресценції) називають залежність інтенсивності світла люмінесценції від довжини або частоти світла:

$$I_{\lambda} = f(\lambda) \quad \text{або} \quad I_{\nu} = f(\nu).$$

де I_{λ} – інтенсивність світла люмінесценції у відносних одиницях при даній довжині хвилі.

Емпіричні закони люмінесценції.

1. **Закон Стоксу:** *спектр флуоресценції лежить в більш довгохвильовій області в порівнянні із спектром поглинання тієї ж сполуки.* Це означає, що середня енергія квантів флуоресценції менше середньої енергії поглинутих квантів. На рис. 2.1 дана закономірність виявляється в тому, що довжина прямих стрілок вгору (електронні переходи при поглинанні світла) в середньому більше довжини стрілок, направлених вниз (електронні переходи при флуоресценції і фосфоресценції). Причина такого явища вже була розглянута вище – це перетворення частини енергії поглиненого фотона на теплову енергію навколишніх молекул.

2. **Правило Каші:** *випускання квантів флуоресценції завжди відбувається з нижнього збудженого рівня молекули, незалежно від того, на який рівень перейшов перед цим електрон в результаті поглинання фотона.* Це означає, що якою б довжиною хвилі не була збуджена молекула (різні вертикальні стрілки вгору на схемі), випромінювання буде відбуватися з одного і того ж стану молекули і спектр флуоресценції у всіх випадках буде однаковим. Отже, спектр флуоресценції (і фосфоресценції) не залежить від довжини хвилі збудливого випромінювання.

Таким чином при проведенні спектро-флуорометричних вимірювань розсіяне об'єктом збудливе світло може бути повністю прибрано за допомогою світлофільтрів або монохроматора і не заважає реєстрації люмінесценції.

3. **Правило Льовшина:** *спектри флуоресценції за формою дзеркального симетричні довгохвильовій смузі спектру поглинання, якщо вони побудовані в шкалі частот (енергій).* Таке явище можна пояснити тим, що властивості молекули, зокрема відстань між коливальними підрівнями і вірогідність переходів на них, близькі у молекул в основному в електронно-збудженому стані. Це говорить про те, що геометрія молекул в електронно-збудженому стані мало змінюється в порівнянні з основним станом.

4. **Закон Вавілова:** *квантовий вихід флуоресценції не залежить від довжини хвилі збудження люмінесценції.* **Квантовим виходом люмінесценції Φ** називають відношення числа квантів, висвітлених у вигляді

люмінесценції, до поглинутих зразком квантів. Ця величина може набувати значень від 0 до 1.

Якісний люмінесцентний аналіз заснований на порівнянні форми спектрів досліджуваної суміші речовин з формою спектру індивідуальних з'єднань, які можуть входити до складу суміші, що вивчається.

Кількісний флуоресцентний аналіз заснований на тому, що при низькій оптичній густині розчинів інтенсивність люмінесценції пропорційна концентрації флуоресціюючої речовини:

$$I_{\lambda} = K\phi I_n = K\phi I_0(1 - T) = K\phi I_0(1 - 10^{-\epsilon cl}) \approx 2.3K\phi I_0 \epsilon cl.$$

Тут K – константа, що залежить від тілесного кута, в межах якого зібрано світло люмінесценції; ширина спектральної області, що вирізується монохроматором або світлофільтром; пропускання монохроматора або світлофільтру і чутливості фотоприймача.

Перевагою реєстрації люмінесценції є те, що потрібно вимірювати інтенсивність флуоресценції при збудженні і реєстрації в відносно широкій області спектру. Для цього добре підходять світлофільтри. Світлофільтр для збудження люмінесценції повинен пропускати світло тільки в області поглинання досліджуваної речовини і не повинен пропускати світло в області, де спостерігається люмінесценція. Світлофільтр для люмінесценції повинен пропускати люмінесценцію, але збудливе світло повинне повністю їм поглинатися.

2.2. Чинники, що впливають на спектр люмінесценції

Мікрооточення – умови середовища, що оточує флуоресціюючі молекули. В разі флуоресценції розчинів речовин найбільший вплив мають діелектрична проникність і в'язкість навколишнього середовища. У табл. 2.1 дано положення максимумів в спектрах поглинання (λ_n) і флуоресценції ($\lambda_{фл}$) сполуки диметиламінохалкона (ДМХ) в розчинниках з різною полярністю (діелектричною проникністю ϵ). Із збільшенням полярності розчинника максимумами в спектрі поглинання і, особливо, в спектрі флуоресценції зрушуються в область великих довжин хвиль.

Молекула ДМХ в основному стані має відносно невеликий дипольний момент $\mu_0 = 17 \cdot 10^{-30}$ Кл·м і, відповідно, помірно сольватована, тобто оточена орієнтованими полярними молекулами розчинника, наприклад води (рис. 2.2). **Сольватація** (від латів. solvo «розчиняю») – електростатична взаємодія між частинками (іонами, молекулами) розчиненої речовини і розчинника.

Поглинання фотона і перехід молекули в збуджений стан супроводжуються збільшенням дипольного моменту молекули $\mu_z = 77 \cdot 10^{-30}$ Кл·м (перехід 1–2, рис. 2.2). Це приводить до поляризації електронних

Таблиця 2.1. Максимуми поглинання і флуоресценції зонду ДМХ в різних розчинниках

Розчинник	Діелектрична проникність, ϵ	λ_p , нм	$\lambda_{фп}$, нм
Гептан	1.9	383	436
Толуол	2.4	402	472
Бутанол	17.7	418	545
Метанол	32.7	418	547
Вода	81	427	560

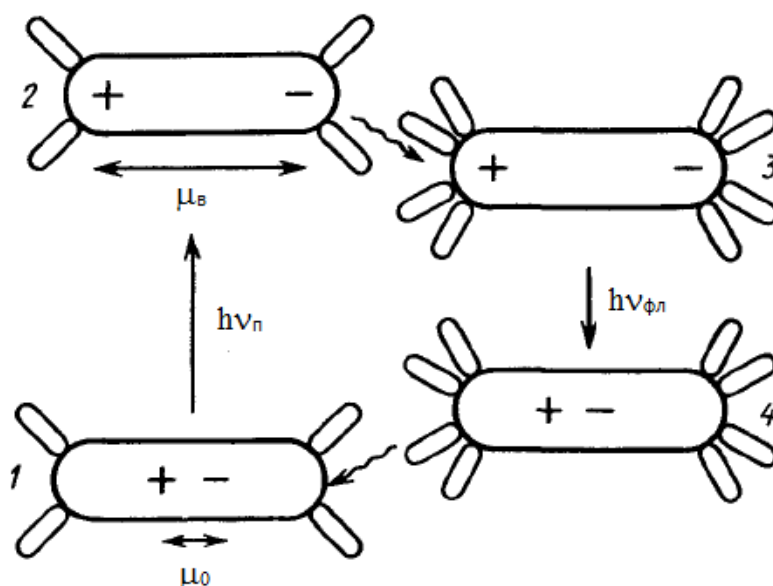


Рис. 2.3. Зміна дипольного моменту і сольватації флуоресцентного зонда після поглинання фотона або випромінюванні фотона флуоресценції: більшими і малими овалами схематично зображені молекули зонда і сольватуєчого розчинника

оболонки навколишніх молекул, індукційному зсуву їх атомів за 10^{-12} – 10^{-13} с і переорієнтації навколишніх молекул (зростанню сольватації, рис. 2.3), що займає вже 10^{-11} – 10^{-8} с. Розтрата енергії на всі ці процеси приводить до довгохвильового зсуву смуги флуоресценції (коротка стрілка під час переходу 3–4 (рис. 2.2)). Дипольний момент при збудженні може змінюватися в будь-яку сторону як по величині, так і по напрямку, проте практично у всіх випадках, що представляють біологічний інтерес, він зростає. У експерименті завжди спостерігають, що положення смуги флуоресценції залежить від розчинника набагато сильніше, ніж положення смуги поглинання.

Зсув смуги, а також різниця між максимумами поглинання і флуоресценції (зсув за законом Стоксу) буде вища за наступних умов:

- велике значення різниці $\mu_3 - \mu_0$;
- навколишні молекули мають високий дипольний момент;

в) рухливість навколишніх молекул (висока текучість або мала в'язкість середовища) і час життя збуджених молекул достатньо великі, щоб за цей час молекули середовища встигли переорієнтуватися.

Явище довгохвильового зрушення спектру флуоресценції в полярному, нев'язкому оточенні лежить в основі застосування флуоресціюючих фарбників (зондів). **Флуоресцентним зондом** називають флуоресціюючу молекулу, яка зв'язується з білками, біологічними мембранами або іншими компонентами клітини нековалентними зв'язками. Як зонди використовують сполуки, параметри люмінесценції яких різко змінюються в залежності від властивостей середовища. Тому, знаючи локалізацію зонда в клітині, можна по люмінесценції судити про фізичні властивості безпосереднього мікрооточення молекул зонда, тобто про властивості білків, мембран, нуклеїнових кислот і інших структур клітин.

Зміна властивостей середовища, що оточує молекули, які люмінесціюють, відображається не тільки на спектрах, але і на квантовому виході люмінесценції. В деяких випадках відмінності в квантовому виході бувають вельми значними. Так, наприклад, квантовий вихід флуоресценції фарбника 1-анілінонафтален-8-сульфоната (АНС) в бутанолі дорівнює 0.66, а у воді – 0.004; відповідно цьому час згасання флуоресценції складає в пропанолі 10.5 нс, а у воді – всього 0.55 нс.

Ефект екранування люмінесценції – спотворення в спектрі люмінесценції, пов'язані з поглинанням частини збудливого світла сторонніми речовинами. Внаслідок чого зменшується кількість фотонів, що поглинаються досліджуваною речовиною. Тим самим знижується інтенсивність люмінесценції:

$$I_{\lambda} = K\phi I_0(1-T)\frac{D}{D_{об}}$$

Тут $D/D_{об}$ – частина світла, поглиненого зразком, яка була поглинена компонентом, здатним до люмінесценції, T – пропускання зразка.

Реабсорбція – це поглинання квантів люмінесценції в товщі самого зразка. Реабсорбція може відбуватися в результаті поглинання фотонів в антистоксовій області самою речовиною, при цьому ослаблюється інтенсивність люмінесценції в короткохвильовій частині спектру (рис. 2.4). В багатокомпонентних системах фотони люмінесценції можуть поглинатися молекулами інших

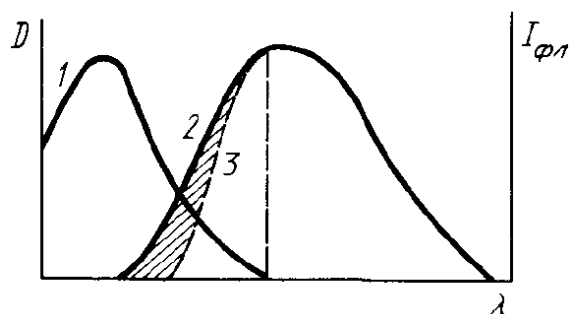


Рис. 2.4. Спотворення спектрів флуоресценції в результаті реабсорбції: 1 – спектр поглинання; 2 і 3 – неспотворений і спотворений відповідно спектри флуоресценції

речовин, характер спотворень спектру люмінесценції у такому разі повністю визначатиметься формою спектру поглинання речовин в системі. Ефект реабсорбції збільшується із зростанням оптичної густини зразка в області реєстрації люмінесценції.

Для оцінки впливу ефекту реабсорбції можна використовувати наступну формулу:

$$I_{\text{л}} = K\phi I_0 \left(1 - 10^{-(D_{\text{з}} + D_{\text{л}})}\right) \frac{D_{\text{л}}}{D_{\text{з}} + D_{\text{л}}},$$

де $D_{\text{з}}$ і $D_{\text{л}}$ – оптична густина розчину в кюветі при довжині хвилі збудження і вимірюваної люмінесценції, відповідно.

У сильно розбавлених розчинах ($D_{\text{з}} + D_{\text{л}} < 0.1$):

$$I_{\text{л}} \approx 2.3K\phi I_0 D_{\text{з}}$$

і реабсорбція не залежить від $D_{\text{л}}$

У дуже концентрованих розчинах ($D_{\text{з}} + D_{\text{л}} \gg 1$):

$$I_{\text{л}} = K\phi I_0 \frac{D_{\text{з}}}{D_{\text{з}} + D_{\text{л}}}.$$

В цьому випадку реабсорбція залежить від співвідношення оптичної густини розчинів в області збудження і люмінесценції.

Для зменшення реабсорбції необхідно:

- 1) використовувати зразки з низькою оптичною густиною;
- 2) вимірювання люмінесценції здійснювати з передньої стінки;
- 3) збуджувати люмінесценцію в максимумі поглинання речовини.

2.3. Гасіння флуоресценції

Швидкість погасання люмінесценції – швидкість її загасання після припинення збудження, яка залежить від часу життя молекул у збудженому стані τ .

Між часом життя молекул у збудженому стані і квантовим виходом люмінесценції існує пряма пропорційна залежність, причина якої з'ясовується при розгляді ймовірності випромінювальних і безвипромінювальних переходів в збуджених молекулах. На рис. 2.4 вертикальних стрілок показують напрям електронних переходів в збудженій молекулі, а величини k_1 , k_2 і k_3 – константи швидкостей відповідних переходів. Перехід 1 супроводжується випусканням фотона (люмінесценцією), переходи 2 і 3 – безвипромінювальні. Перехід 2 пов'язаний з

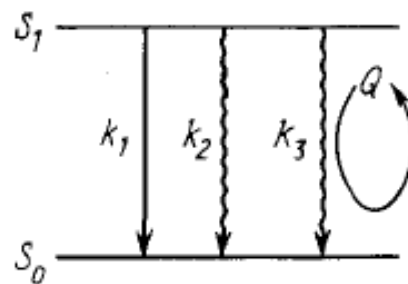


Рис. 2.5. Дезактивація збудженої молекули в присутності гасника

внутрішніми властивостями самої молекули, що здатна до люмінесценції. Він здійснюється через люмінесценцію або через триплетний стан. Перехід 3 має місце при взаємодії збудженої молекули із сторонньою молекулою гасника люмінесценції.

Час життя збудженого стану молекул зменшується із збільшенням загальної вірогідності всіх переходів $S_1 \rightarrow S_0$. Квантовий вихід залежить від співвідношення вірогідності випромінювального і безвипромінювальних переходів.

Для кількісного опису процесів представимо поглинання, люмінесценцію і безвипромінювальні переходи у формі рівнянь хімічних реакцій:

	хімічна реакція	швидкість реакції
поглинання кванта	$S_0 + h\nu_n \rightarrow S_1$	$w_0 = k_0 I_0 [S_0]$
люмінесценція	$S_1 \rightarrow S_0 + h\nu_l$	$w_1 = k_1 [S_1]$
внутрішньо-молекулярне гасіння	$S_1 \rightarrow S_0$	$w_2 = k_2 [S_1]$
гасіння молекулою гасника	$S_1 + Q \rightarrow S_0 + Q$	$w_3 = k_3 [S_1] [Q]$

Тут $[S_0]$, $[S_1]$ – концентрації незбуджених і збуджених молекул, $[Q]$ – концентрація молекул гасника.

Розглянемо три основні випадки впливу молекул гасника Q :

1. Молекули Q присутні в великому надлишку, отже, висока ймовірність знаходження збуджених молекул M^* і Q в момент збудження на відстані, де взаємодія значна. Таким чином, не вимагається взаємне зіткнення M^* і Q за час життя збудженого стану. Якщо ймовірність знаходження молекули гасника на відстані від M^* , де можливе зіткнення, менше 1, то цей процес відноситься до **статичного** гасіння.

2. Молекул Q в недовліку і взаємне зіткнення M^* і Q неможливе за час життя збудженого стану (із-за високої в'язкості середовища або дуже короткого часу життя). Це випадок далекодіючого **безвипромінювального переносу енергії**.

3. Молекул Q в недовліку і взаємне зіткнення M^* і Q можливо за час життя збудженого стану. Цей процес відноситься до бімолекулярних і називається **динамічним гасінням**. При високих концентраціях Q разом з динамічним гасінням можливим стає і статичне гасіння. Процес динамічного гасіння відноситься до процесів, контрольованих дифузією і, як наслідок, константа швидкості гасіння залежить від часу.

Оскільки при безперервному освітленні система знаходиться в стаціонарному стані, загальне число переходів із збудженого стану в основне в одиницю часу ($w_1 + w_2 + w_3$) дорівнює числу квантів світла w_0 , по-

глинених за цей час. Число випромінювальних переходів w_1 дорівнює числу випромінених фотонів люмінесценції. Відношення w_1 до w_0 або до $(w_1 + w_2 + w_3)$ є, за визначенням, квантовим виходом люмінесценції:

$$\Phi_Q = \frac{k_1}{k_1 + k_2 + k_3[Q]}.$$

У відсутності гасника Q квантовий вихід флуоресценції буде вищий:

$$\Phi = \frac{k_1}{k_1 + k_2}.$$

Ступінь гасіння флуоресценції молекулою-гасником може бути виражена **рівнянням Штерна-Фольмера**:

$$\frac{\Phi}{\Phi_Q} = 1 + \frac{k_3}{k_1 + k_2}[Q] = 1 + K[Q].$$

Оскільки при гасінні люмінесценції по описаному механізму зміни поглинання флуоресціюючої речовини у присутності гасника не відбувається, рівняння **Штерна-Фольмера** можна записати і у вигляді:

$$\frac{I_{\text{фл}}}{I_{\text{фл}Q}} = 1 + K[Q],$$

де $I_{\text{фл}}$ $I_{\text{фл}Q}$ – інтенсивності флуоресценції при одному і тому ж способі збудження розчинів за відсутності і в присутності гасника.

Рівняння Штерна-Фольмера припускає пряму пропорційність між $I_{\text{фл}}/I_{\text{фл}Q}$ і концентрацією гасника Q , нахил прямої на графіці дозволяє знайти константу, яка може служити мірою ефективності гасника.

Для вивчення кінетики загасання люмінесценції можна вимірювати інтенсивність люмінесценції $I_{\text{л}}$ як функцію часу t після потужного імпульсного (наприклад, лазерного) освітлення об'єкту в момент $t = 0$.

Інтенсивність люмінесценції теж залежить від часу: $I_{\text{л}} \sim k_1[S_1]$. Швидкість зменшення збуджених станів $d[S_1]/dt = -k_1[S_1]$. Тому люмінесцентне випромінювання затухає по експоненціальному закону. Побудувавши графік $\ln(I/I_0) = f(t)$,

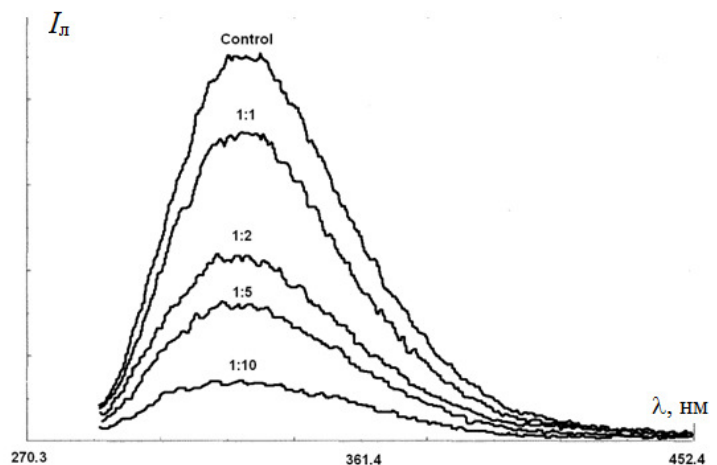


Рис. 2.6. Залежність інтенсивності флуоресценції триптофанів родопсину від концентрації повністю-транс-ретиналю ($\lambda_{\text{збуд}} = 280$ нм)

можна визначити ϕ .

Величина k_1 має розмірність частоти (с^{-1}), а обернена до неї величина $\tau_0 = 1/k_1$ має розмірність часу і називається **середнім випромінювальним часом життя молекул** у збудженому стані.

Такий час життя спостерігався б у відсутності яких би то не було процесів гасіння, тобто при квантовому виході флуоресценції, рівному одиниці.

В реальних умовах із-за процесів гасіння швидкість безвипромінювальних переходів не дорівнює нулю, і сумарна константа першого порядку переходу $S_1 \rightarrow S_0$ рівна $(k_1 + k_2 + k_3[Q])$. Обернена до неї величина є **середнім часом життя молекул** у збудженому стані:

$$\tau_Q = 1 / (k_1 + k_2 + k_3[Q]).$$

Час τ_0 є максимально можливим часом життя збудженого стану. Гасник, прискорюючи перехід $S_1 \rightarrow S_0$, зменшує часу життя збудженого стану:

$$\tau / \tau_Q = 1 + k_3\tau[Q] = 1 + K[Q].$$

Паралельне зниження ϕ і τ по мірі збільшення концентрації гасника називається **динамічним гасінням флуоресценції**.

Тобто, незалежно від наявності гасників люмінесценції реальний час життя молекул даного виду τ пропорційний квантовому виходу флуоресценції $\tau / \tau_Q = \phi$.

Чим інтенсивніше смуга поглинання речовини, тим менше час життя молекул у збудженому стані і навпаки.

Найбільш **активні гасники** флуоресценції:

1) важкі аніони і катіони I^- , Br^- , Cs^+ , Cu^{2+} (при цьому полегшується $S_1 \rightarrow T_1$ перехід);

2) парамагнітні іони та молекули O^2 , Mn^{2+} , нітрокисильні радикали;

3) молекули розчинника. Найбільшою гасячою дією володіють зазвичай полярні розчинники, такі, як вода; гасіння, мабуть, пов'язане з полегшенням $S_1 \rightarrow T_1$ переходу в молекулі флуоресціюючої сполуки;

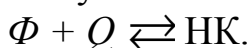
4) акцептори електронної енергії збудження.

Слід зазначити, що гасячу дію молекул розчинника важко оцінити кількісно. Оскільки люмінесценція біологічно важливих речовин завжди вимірюється в тому або іншому розчиннику, можна лише порівнювати квантові виходи флуоресценції речовини в різних розчинниках. Оскільки концентрація розчинника постійна, гасіння розчинником входить у величину константи k_2 . Гасниками у вужчому сенсі називають тому зазвичай не розчинник, а розчинені в нім молекули інших сполук, зі збільшенням концентрації яких квантовий вихід знижується. Константа зазвичай достатньо велика, і тому квантовий вихід флуоресценції перева-

жної більшості забарвлених органічних сполук у відсутності сторонніх гасників складає частки відсотка. Такі речовини вважаються **нелюмінесцентними**. **Флуоресцентними** можна вважати сполуки з квантовим виходом флуоресценції вище 0.01. Флуоресцентні фарбники мають квантові виходи, які вимірюються відсотками і навіть десятками відсотків.

Збільшення температури, як правило, різко знижує квантовий вихід і, отже, інтенсивність люмінесценції (**температурне гасіння люмінесценції**).

Статичне гасіння пов'язане з утворенням нефлуоресцентних комплексів НК флуоресціюючих молекул Φ з молекулами гасника Q :



По характеру залежності інтенсивності флуоресценції від концентрації гасника статичне і динамічне гасіння невиразне. Але при статичному гасінні не відбувається скорочення часу життя збудженого стану; зменшується лише частка молекул, що здатна до флуоресценції, але всі її характеристики (окрім квантового виходу) не змінюються.

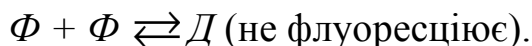
Так, якщо в досліджуваній системі молекул Φ і Q одночасно відбувається темне утворення нефлуоресцентних комплексів і динамічне гасіння збуджених молекул Φ^* , то гасіння флуоресценції буде яскравіше виражено в порівнянні зі скороченням τ . В цьому випадку залежність ефективності гасіння від концентрації гасника стає нелінійною.

Тому, для визначення константи Штерна-Фольмера користуються модифікованим рівнянням, що має вигляд:

$$\tau / \tau_0 = (1 + k_Q \tau [Q]) (1 + K [Q]),$$

де k_Q – константа динамічного гасіння.

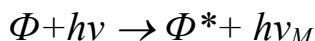
Окремим випадком статичного гасіння є так зване концентраційне гасіння, яке пов'язане з **утворенням нефлуоресціюючих димерів** і крупніших агрегатів молекул при високій концентрації флуоресціюючої речовини:



Явище концентраційного гасіння широко поширене і у ряді випадків знаходить корисне застосування. Так, наприклад, можна спостерігати за накопиченням клітками або мітохондріями деяких флуоресціюючих фарбників по ефекту гасіння флуоресценції. По мірі накопичення речовини його концентрація в навколишньому середовищі падає. Всередині кліток або органел концентрація фарбника виявляється вельми високою і утворюються нефлуоресціюючі комплекси. До цього іноді додається гасіння за рахунок комплексоутворення з внутрішньоклітинними сполуками, наприклад гемопротеїдами. До фарбників, накопичення яких клітками супроводжується гасінням, належить 9-аміноакридин. Це з'єднання цікаве тим, що накопичується в клітках, хлоропластах і мі-

тохондріях, якщо в них відбувається зниження рН. Таким чином, вдається вимірювати внутрішньоклітинний або внутрішньомітохондріальний рН по ступеню гасіння флуоресценції аміноакридина, доданого до суспензії.

Особливий інтерес представляє *утворення збуджених димерів флуоресціюючих молекул (ексимерів)* при кінетичному зіткненні збудженої молекули з незбудженою:



Прикладом сполуки, що утворює ексимер, є пірен.

Флуоресцентна смуга ексимера зазвичай зміщена в довгохвильову область (рис. 2.7).

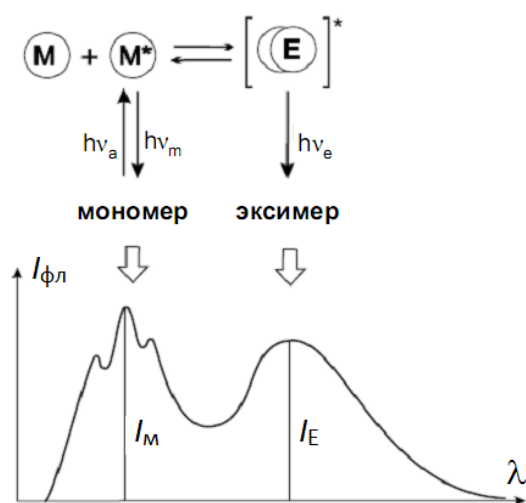


Рис. 2.7. Утворення ексимерів і спектри флуоресценції

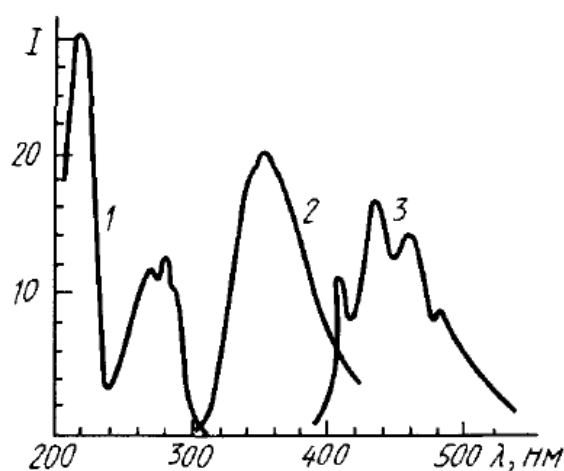


Рис. 2.8. Спектр збудження флуоресценції (1) і спектри флуоресценції (2) і фосфоресценції (3) триптофану.

Ексиплекси – це комплекси у збудженому стані. Вони утворюються в результаті зіткнення збудженої молекули (донором або акцептором) з іншою неподібною незбудженою молекулою (донором або акцептором). Утворення ексимерів і ексиплексів відноситься до процесів, контрольованих дифузією, тому їх прояв можна зафіксувати при достатньо високих концентраціях, коли висока ймовірність зіткнення частинок.

2.4. Фосфоресценція

У заморожених розчинах речовин, що здатні до люмінесценції, при низьких температурах, наприклад при температурі рідкого азоту (77 К), додатково до розглянутої вище флуоресценції, як правило, з'являється нова смуга люмінесценції, що лежить в більш довгохвильовій області. Час погасання цього випромінювання після перекидання збудливого світла обчислюється іноді секундами або навіть десятками секунд і, в усякому разі, перевищує 10^{-4} с. Таке довгохвильове поволі затухаюче

свічення називають **фосфоресценцією**. Причому спектри збудження флуоресценції і фосфоресценції співпадають. На рис. 2.8 представлені спектри флуоресценції, фосфоресценції і збудження люмінесценції триптофану.

Фосфоресценція відповідає електронному переходу з рівня T_1 (триплетного), що лежить нижче рівня збудженої молекули S_1 (синглетного). Велике значення τ фосфоресценції говорить про те, що перехід з цього рівня мало ймовірний: його ймовірність 4-9 порядків нижча, ніж для флуоресценції. Тому цей фосфоресцентний рівень називають метастабільним (напівстійким). Під час переходу молекули на метастабільний рівень відбувається обернення спіну електрона, тобто що такий рівень є триплетним.

Низька ймовірність прямого переходу $T_1 \rightarrow S_0$ і, отже, і $S_0 \rightarrow T_1$ має два наслідки:

1. Великий випромінювальний час життя триплетних молекул робить вельми вірогідним гасіння фосфоресценції за рахунок внутрішніх і міжмолекулярних процесів гасіння. Це приводить до того, що при кімнатній температурі фосфоресценція розчинів практично завжди відсутня, тоді як флуоресценцією володіють багато сполук. Тільки у дуже в'язких розчинах, наприклад «скло» із застиглої борної кислоти або в заморожених рідким азотом розчинах, можна спостерігати сильну фосфоресценцію багатьох сполук, зокрема ароматичних амінокислот і білках, а також нуклеотидів і т. д.

2. Смуга поглинання, відповідна прямому переходу $S_0 \rightarrow T_1$, слабо виражена. Оскільки коефіцієнт поглинання ϵ приблизно обернено пропорційний τ_0 , то ϵ смуги $S_0 \rightarrow T_1$ поглинання в такої молекули, як триптофан, для якого τ рівне ~ 4 с, повинно бути відповідно в 10^9 разів менше, ніж ϵ основної смуги поглинання, що відповідає $S_0 \rightarrow S_1$ переходу (τ флуоресценції дорівнює 10^{-9} с). Оптична густина розчину триптофану товщиною 1 см в концентрації $2 \cdot 10^{-5}$ моль/л при 280 нм ≈ 0.1 . Таку ж оптичну гуστину дає полоса поглинання за рахунок $S_0 \rightarrow T_1$ переходу, якщо концентрацію триптофану збільшити до 1 моль/л, а довжина кювети – 100 м.

Виявлення молекул в триплетному стані засноване на вимірюваннях фосфоресценції, поглинання сві-

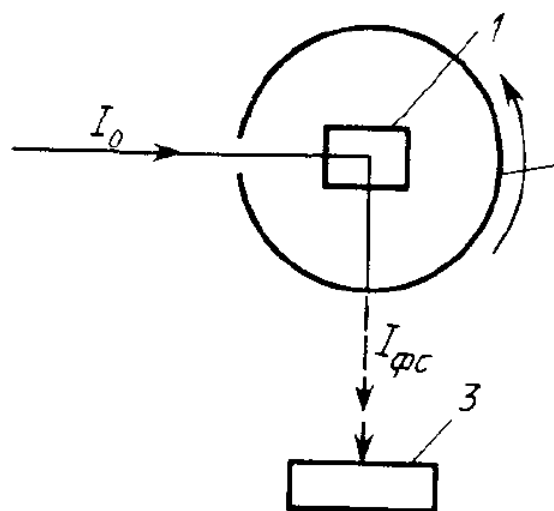


Рис. 2.9. Фосфороскоп: 1– кювета, 2– обертаючий циліндр с прорізами, 3 – детектор

тла молекулами в триплетному стані за рахунок $T_1 \rightarrow T_2$ переходу або реєстрації сигналу електронного парамагнітного резонансу триплетних молекул.

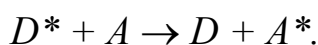
Вимірювання спектрів фосфоресценції іноді вдається проводити на тих же приладах, на яких вимірюють флуоресценцію. Цей метод придатний тільки для дослідження речовин, що добре фосфоресціюють, при низьких температурах, оскільки при кімнатній температурі фосфоресценція має низький квантовий вихід, на декілька порядків нижче за флуоресценцію. Виділити фосфоресценцію із загального спектру люмінесценції і розсіяного збудливого світла можна користуючись фосфороскопом. Робота фосфороскопа заснована на тому, що вимірювання випромінювання зразка проводиться після перекривання збудливого світла, яке, так само як і флуоресценція, не може таким чином потрапити безпосередньо на приймач випромінювання (рис. 2.9).

Завдяки застосуванню фосфороскопа вдається вимірювати спектри фосфоресценції при кімнатних температурах, не дивлячись на вельми низьку інтенсивність свічення. Вимірювання τ фосфоресценції здійснити простіше, ніж τ флуоресценції, оскільки тривалість погасання фосфоресценції істотно більша. При температурі рідкого азоту τ обчислюється секундами і погасання фосфоресценції після перекривання збудливого світла може бути записане безпосередньо на самописці або на осцилографі з повільною розгорткою. Обробка кривих загасання здійснюється так само, як і для флуоресценції.

Під дією світла частина молекул переходить в триплетний стан (переходи $S_0 \rightarrow S_1$ і $S_1 \rightarrow T_1$). Проте накопичити в цьому стані кількість молекул, достатню для вимірювань спектрів поглинання триплетних молекул (переходи $T_1 \rightarrow T_2$ або $T_1 \rightarrow T_3$), при звичайних інтенсивностях збудливого світла не вдається, оскільки одночасно відбувається зворотній процес – перехід молекул з триплетного стану в основний. Потрібна велика потужність збудливого світлового пучка, щоб в триплетному стані опинилася відчутна частина всіх молекул. Подібною потужністю володіють імпульсні лампи або імпульсні лазери (потужність спалаху перевищує інтенсивність звичайних джерел в $10^5 - 10^6$ разів).

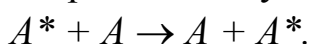
2.5. Сенсibilізу́юча флуоресценція

Перенос енергії електронного збудження між двома молекулами можна представити у вигляді схеми



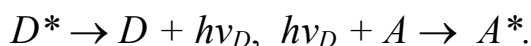
В результаті переносу енергії збуджена молекула донора енергії D^* переходить в основний (незбуджений) стан D , а молекула акцептора енергії переходить з незбудженого стану A в збуджене A^* . Слід зазначи-

ти, що донором і акцептором енергії можуть бути не обов'язково молекули різних речовин, але також і різні молекули однієї і тієї ж речовини:



Перенос енергії між однаковими молекулами (який може бути багатократним) називають міграцією енергії (з *латин.* migratio – блукання).

Одним з можливих способів переносу енергії між молекулами донора і акцептора є **випромінювальним**. Він полягає в тому, що молекула D^* випромінює квант флуоресценції, а молекула A його поглинає (реабсорбція):



При достатньо малих відстанях між молекулами донора і акцептора перенос стає **безвипромінювальним**. Він може відбуватися у момент тісного контакту молекул при їх кінетичних зіткненнях. У той же час є два безконтактні безвипромінювальні способи переносу енергії: індуктивно-резонансний і обмінно-резонансний. Найбільш відомі наступні:

Перенос енергії		
Синглет-синглетний	$^1D^* + ^1A \rightarrow ^1D + ^1A^*$	(I)
Триплет-синглетний	$^3D + ^1A \rightarrow ^1D + ^1A^*$	(II)
Триплет-триплетний	$^3D + ^1A \rightarrow ^1D + ^3A$	(III)

Процеси переносу енергії може відбуватися як в рідких розчинах, так і в густих середовищах. Вони можуть бути виявлені по гасінню люмінесценції донора або по виникненню люмінесценції акцептора. Процеси (II) і (III) можна також виявити по ослабленню $T-T$ поглинання донора, а процес (III) – так само по появі $T-T$ поглинання акцептора. Якщо молекули акцептора в стані $^1A^*$ або ^3A хімічно активні, то перенос енергії приводить до сенсibilізованих реакцій. Навпаки, якщо молекули донора $^1D^*$ або ^3D здатні вступати в хімічні реакції, то перенос енергії може приводити до «захисту» молекули D від хімічних перетворень.

Перенос енергії відбувається тільки у тому випадку, коли нульовий коливальний рівень молекули донора $^1D^*$ або ^3D розташований вище за нульовий коливальний рівень молекули акцептора в стані $^1A^*$ або ^3A . Перенос енергії відбувається по двох різних механізмах.

Методи вивчення переносу енергії між різними молекулами:

1. Вимірюють зниження квантового виходу флуоресценції донора у присутності акцептора енергії.

2. Вимірюють сенсibilізовану (донором) флуоресценцію акцептора енергії. Явище сенсibilізованої люмінесценції полягає в тому, що під дією випромінювання, що поглинається в основному молекулами донора, відбувається випромінювання квантів флуоресценції молекулами акцептора енергії.

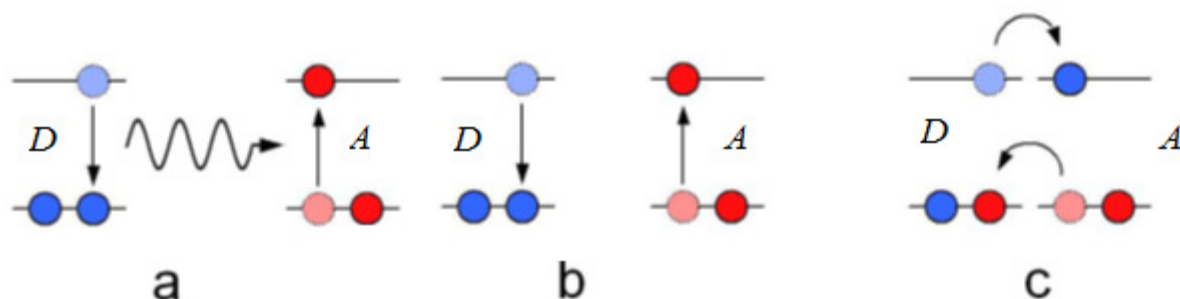
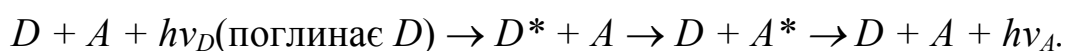


Рис. 2.10. Основні механізми передачі енергії в системі донор-акцептор: а) радіаційний механізм переносу енергії ($R > \lambda$, де λ – довжина хвилі світла люмінесценції), б) FRET ($R > 10\text{Å}$, диполь-дипольний перенос енергії по механізму Ферстера) ; в) обмінно-резонансний механізм ($R < 10\text{Å}$);



3. Вимірюють сенсibilізовану фотохімічну реакцію: випромінювання, що діє, поглинається в основному молекулами донора енергії, а молекули акцептора вступають у фотохімічний процес.

4. Для виявлення переносу можна виміряти скорочення часу погасання флуоресценції донора (τ_D) у присутності акцептора, а також збільшення τ_A при збудженні в смузі поглинання донора, оскільки при переносі від D^* до A час τ_A включає час життя молекул донора до моменту переносу енергії і час життя збудженого стану акцептора енергії.

Індуктивно-резонансний перенос енергії. Синглет-синглетний перенос енергії (I) між донором D^* і акцептором енергії A зазвичай здійснюється в результаті кулонівського, перш за все диполь-дипольної взаємодії молекул донора і акцептора. Молекула донора з нульового коливального рівня збудженого стану переходить на основний електронний рівень, одночасно молекула акцептора переходить на ізоенергетичний (резонансний) рівень збудженого стану (рис. 2.11). Цей механізм переносу енергії отримав назву **індуктивно-резонансного**.

Ефективність резонансного переносу енергії Ферстера (FRET) обернено пропорційна шостому ступеню відстані між донором і акцептором, що робить цей перенос надзвичайно чутливим до невеликих змін відстані. Радіус взаємодії набагато менший, ніж довжина хвилі випромінюваного світла. В ближній зоні збуджений хромофор випускає віртуальний фотон, який миттєво поглинається приймаючим хромофором. Ці віртуальні фотони неможливо виявити, оскільки їх існування порушує закон збереження енергії і імпульсу, і тому FRET відомий як безвипромінювальний механізм.

Для здійснення переносу енергії необхідне виконання **умови**

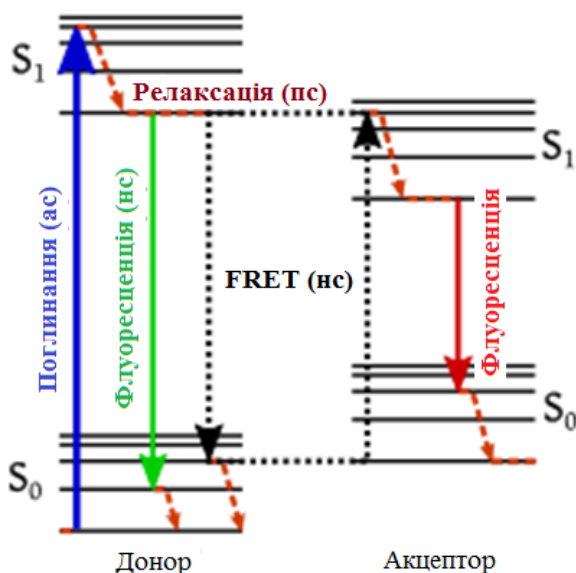


Рис. 2.11. Діаграма резонансного переносу енергії Ферстера з типовими часовими масштабами. Чорна пунктирна лінія вказує на віртуальний фотон

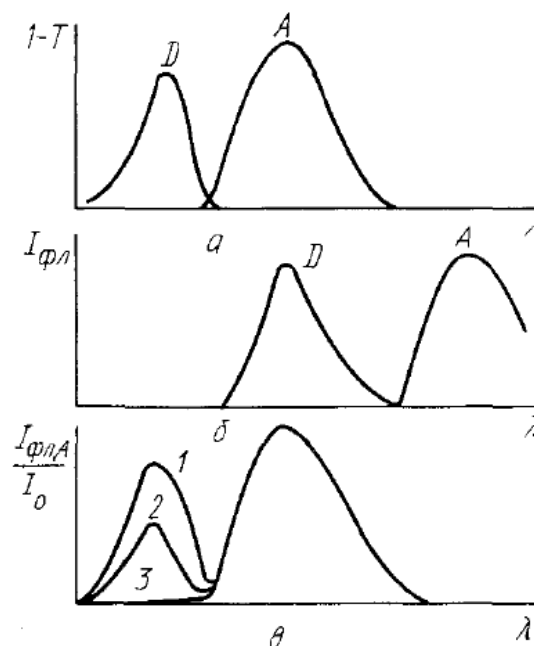


Рис. 2.12. Індуктивно-резонансний перенос енергії. Спектри: а) поглинання; б) флуоресценції; D – донора і A – акцептора; в) збудження флуоресценції акцептора при 100%-ному переносі енергії від донора (1), частковий перенос (2) і за відсутності переносу (3)

резонансу – різниця енергій між основним і збудженим електронними рівнями обох молекул повинна бути однакова (збіг власних частот осциляторів), і **умови індукції** – взаємодія між молекулами повинна бути достатньо сильною. Для дотримання цих умов необхідне виконання наступних **правил**:

1) донор енергії D^* повинен володіти здібністю до люмінесценції, оскільки вірогідність переносу пропорційна константі швидкості випромінювального переходу в молекулі донора;

2) спектр флуоресценції донора повинен перекриватися із спектром поглинання акцептора (умова резонансу);

3) молекули донора і акцептора повинні достатньо зближувати, оскільки вірогідність переносу енергії обернено пропорційна шостому ступеню відстані R між ними;

4) донор і акцептор повинні бути вдало орієнтовані один щодо одного (орієнтаційний чинник Φ^2). Якщо дипольні моменти випромінювання донора і поглинання акцептора перпендикулярні один одному, то перенос енергії здійснюватися не буде ($\Phi^2 = 0$). Якщо напрям моментів співпадає з напрямом радіусу-вектора, що сполучає D^* і A , то ймовір-

ність переносу максимальна ($\Phi^2 = 4$). В розчинах при хаотичній орієнтації молекул і їх швидкому обертанні $\Phi^2 = 2/3$.

Один з поширених експериментальних методів знаходження ефективності перенесення енергії полягають у вимірюванні спектрів збудження флуоресценції акцептора енергії в системі, де є і донор D , і акцептор A .

Наприклад, в розчині присутні молекули D і A . Обидві речовини здатні до люмінесценції. Спектр флуоресценції D перекривається зі спектром поглинання A (рис. 2.12). Якщо при вимірюванні спектру збудження люмінесценції речовини A буде зареєстрована крива 1, співпадаюча із спектром поглинання суміші, то це свідчитиме про 100%-ний перенос енергії збудження від D^* до A . Крива 2 – частковий перенос енергії, 3 – немає переносу. Для того, щоб виключити тривіальну реабсорбцію, потрібно користуватися достатньо тонкими кюветами, оптична густина в максимумі поглинання A повинна бути нижче 0.1. За відсутності реабсорбції поява короткохвильового максимуму на кривих 1 або 2 можна пояснити тільки перенесенням енергії. Флуоресценція речовини A за рахунок фотонів, поглинених D , називається **сенсibiliзованою**. Ефективність перенесення енергії W дорівнює відношенню площі під кривою 2 до площі під кривою 1.

Відстань, при якій ефективність переносу $W_0 = 0.5$, називають **радіусом Ферста** R_0 . Для більшості систем його величина складає 20–50 Å.

Зв'язок між ефективністю W і відстанню R між молекулами донора і акцептора наступна:

$$\frac{W}{1-W} = \left(\frac{R_0}{R} \right)^6, \quad R_0^6 = \alpha \Phi^2 \varphi_D \frac{S_{AD}}{S_D},$$

де $\alpha = 9 \cdot 10^3 \cdot \ln 10 / (128 \pi^5 n^4 N_A)$ – коефіцієнт пропорційності, n – показник заломлення; N_A – число Авогадро; φ_D – квантовий вихід флуоресценції донора; Φ^2 – чинник взаємної орієнтації векторів електронного переходу в молекулі донора при випусканні і в молекулі акцептора при поглинанні фотона;

$S_{AD} = \int_0^\infty F_D(\nu) \epsilon_A(\nu) \nu^{-4} d\nu$ – інтеграл перекривання спектрів флуоресценції донора і поглинання акцептора (рис. 2.13); $F_D(\nu)$ – інтенсивність флуоресценції донора в

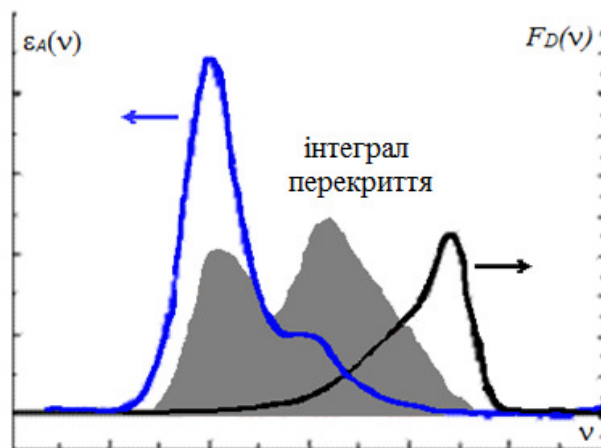


Рис. 2.13. Приклад ядра інтегралу перекриття

відносних одиницях (спектр флуоресценції); $\varepsilon_A(\nu)$ – молярний коефіцієнт поглинання акцептора (спектр поглинання акцептора)

$S_D = \int_0^{\infty} F_D(\nu) d\nu$ – площа під кривій флуоресценції донора.

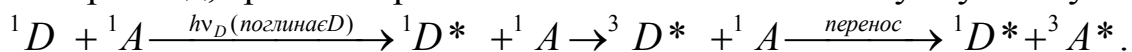
Вимірювання ефективності FRET можуть використовуватися для визначення відстані один від одного між двома флуорофорами. Такі вимірювання використовуються як інструмент дослідження в таких областях, як біологія і хімія. Наприклад, для визначення товщини ліпідного бішару або для визначення білкової глобули в мембрані.

Характерна особливість індуктивно-резонансного переносу енергії – великі відстані, на яких перенос ефективно здійснюється. Варто відзначити, що концентраційна залежність різних явищ, пов'язаних з індуктивно-резонансним переносом енергії, суворо кажучи, не підкоряється рівнянню Штерна-Фольмера.

Триплет-синглетний перенос енергії (II) було виявлене Ермолаєвим і Свешніковою в розчинах при 77° К. Вони показали, що триплет-синглетний перенесення відбувається по індуктивно-резонансному механізму. Таким чином, до цього типу переносу енергії застосовуються всі приведені вище рівняння з тою лише відмінністю, що ефективність переносу визначається перекриттям спектрів фосфоресценції донора і поглинання акцептора.

Обмінно-резонансний перенос енергії. Триплет-триплетний перенос енергії здійснюється по обмінному механізму і характеризується малим радіусом дії, близьким до суми радіусів молекул. Фактично він відбувається тільки при безпосередньому контакті молекул. Разом з тим він може здійснюватися лише в тому випадку, якщо електронні оболонки розташованих рядом молекул D^* і A перекриваються, що дозволяє двом молекулам обмінюватися збудженими електронами. Відстань переносу у відсутності дифузії невелика і складає 1.1 – 1.3 нм, що відповідає концентраціям акцептора 0.2 – 0.3 М (М = моль/л).

Наприклад, триплет-триплетний механізм має наступну схему:



Експериментально виявити такий перенос вдалося завдяки підбору вдалих пар донор – акцептор, зокрема бензальдегід і нафталін. У бензальдегіду S_1 стан знаходиться нижче S_1 стану нафталіну (рис. 2.14). Якщо опромінювати цю суміш при 366 нм, то можна збуджувати тільки донор, нафталін же поглинає випромінювання з $\lambda < 310$ нм. Тим самим виключається безпосереднє збудження акцептора, а також синглет-синглетний перенос енергії від D^* до A із-за недотримання умови резонансу. В той же час рівень T_1 нафталіну знаходиться нижче за

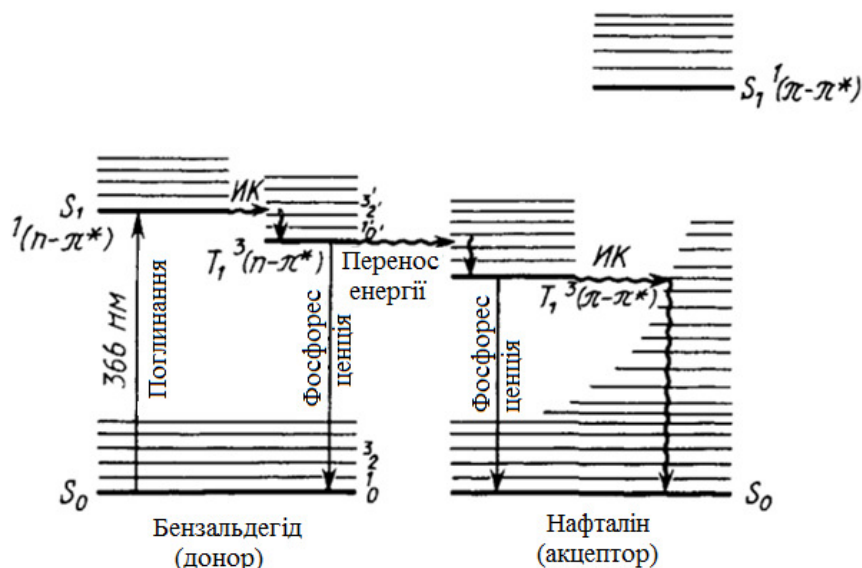


Рис. 2.14. Обмінно-резонансний перенос енергії від бензальдегіда на нафталін

рівень бензальдегіду; це сприяє протіканню триплет-триплетного перенесення енергії. Сенсибілізовану бензальдегідом фосфоресценцію нафталіну спостерігали при 77 К в розчиннику ефір - етанол.

Відоме невелике число прикладів обмінно-резонансного переносу енергії в біологічних системах. Так, передбачається, що в листях рослин за рахунок обмінно-резонансного переносу відбувається гасіння триплетних збуджених станів хлорофілу каротиноїдами. Каротиноїди шляхом гасіння триплетів хлорофілу запобігають фотогенерації хлорофілами синглетного кисню, тим самим захищають фотосинтетичний апарат від окислювального пошкодження. Відомо, що безкаротіноїдні мутанти фотосинтезуючих організмів гинуть на світлі.

В двоспиральній ДНК відбувається триплет-триплетний перенос енергії між нуклеотидами в бік тиміну, що сприяє переважному утворенню саме тимінових димерів при УФ опроміненні ДНК.

2.6. Застосування флуоресценції

1. Для визначення конкретних речовин. Якщо квантовий вихід люмінесценції більше 1%, то такі сполуки легко виявляються люмінесцентним методом.

Високим квантовим виходом володіє триптофан ($\lambda_{\text{max}} = 350\text{nm}$), флавіни, НАД·Н і НАДФ·Н, вітаміни А, В₆, Е, деякі лікарські речовини – хінін, деякі канцерогени: бензопірен, дибензантрацен.

При збудженні ближнім ультрафіолетом (365nm) виявляються грибкові інфекції волосся по жовто-зеленій флуоресценції, дерматомікози у тварин. Деякі сполуки, що спочатку не володіють флуоресценцією, після хімічної обробки дають сполуки, що володіють високим квантовим виходом. Це героїн, морфін, вітаміни С, В, В₁₂. Чутливість таких

методів – до 10^{-8} грама (або приблизно до 10^{-10} М).

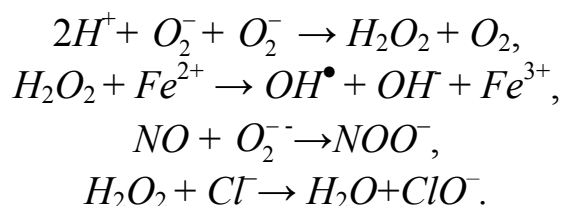
2. Для визначення в'язкості середовища. Ступінь поляризації флюоресценції (частка поляризованого світла в загальній сумарній інтенсивності флюоресценції) – важливий показник для дослідження в'язкості середовища, що містить молекулу, здатну до флюоресценції. Якщо збудливе світло поляризоване, то і флюоресценція буде поляризована. Але якщо за час життя молекули у збудженому стані (τ) молекула встигне повернутися, то ступінь поляризації буде нижчий, ніж у разі, коли вона залишалася нерухомою.

3. Для визначення активності нейтрофілів і макрофагів.

Різними дослідниками виявлено, що активовані нейтрофіли і макрофаги продукують супероксидний радикал O_2^- (виявлено по відновленню цитохрому С, а також по індукованій люмінолом хемілюмінесценції).

Люмінол – органічна сполука з формулою $C_8H_7N_3O_2$. Є білими або ясно-жовтими кристалами. Добре розчинний в полярних органічних розчинниках, проте практично нерозчинний у воді. Люмінол є речовиною, здібною до хемілюмінесценції. Він випускає синє випромінювання при взаємодії з деякими окислювачами.

У неактивованих кліток продукція активних форм кисню не зафіксована. Супероксид зазнає наступні перетворення з утворенням сильних окислювачів:



Виявлення супероксидів проводиться за допомогою люмінол-залежної хемілюмінесценції.

4. Люмінесцентна мікроскопія. При люмінесцентній мікроскопії можна вивчати первинну (тканини і органи людини і тварин мають нерізку білясту, блакитну або синю люмінесценцію) і вторинну люмінесценцію кліток і тканин. Вивчення вторинної люмінесценції живих і фіксованих клітин і тканин (після їх «забарвлення» флюорохромами) отримало широке розповсюдження. При вивченні живих клітин флюоресцентні речовини застосовують в дуже малих кількостях, що не викликають токсичної дії. У цитологічних дослідженнях люмінесцентну мікро-

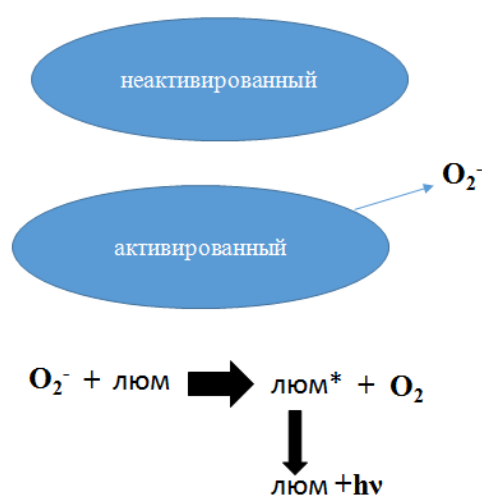


Рис. 2.15. Флуоресценція активованих нейтрофілів і макрофагів

скопію застосовують при діагностиці злоякісних новоутворень в соскобах, пунктатах, мокроті, промивних водах. Цей метод дозволяє швидко отримати яскраво забарвлений препарат, в якому атипів клітки виділяються яскравим світінням, відтінками кольору і структурою. Люмінесцентна мікроскопія застосовується і в гистохимії. Використання акридінового помаранчевого дозволяє виявити нуклеїнові кислоти, при цьому ДНК дає зелену, а РНК – червону флюоресценцію. Той же флюорохром в нефіксованих зрізах допомагає виявити мукополісахариди, а при модифікації цього методу – муцини. Фосфін 3R, родамин В, бензопірен та ін. виявляють в зрізах ліпіди.

5. Імуноферментний аналіз. Це метод флюоресціюючих антитіл – набір імунологічних методів для якісного і кількісного визначення поверхневих і внутріклітинних антигенів в зразках клітинних суспензій (культур кліток, бактерій, мікоплазм, рикетсій, вірусів), зразків крові, кісткового мозку, альвеолярних змивів, тонких тканинних зрізів.

При прямому методі (пМФА) на досліджуваний препарат або в суспензію кліток наносять розчин прямо мічених флюоресцентним фарбником антитіл. Утворення комплексу антиген-антитіло виявляється флюоресцентним сигналом у вигляді світіння різного ступеня інтенсивності і чіткості.

При непрямому методі (нМФА) на препарат наносять антитіла проти шуканих антигенів (т.з. «перші» антитіла), а потім видоспецифічні «другі» антитіла проти «перших» антитіл, що дозволяє уникнути неспецифічних реакцій. При цьому тільки другі антитіла кон'юговані з флюоресцентним фарбником. Наприклад, якщо при дослідженні як «перші» антитіла використовуються мишачі антитіла – mouse IGG, то як «другі» використовуються антивидові anti-mouse IGG кон'юговані з флюоресцентним фарбником. Комплекс антиген-антитіло дає флюоресцентне фарбування тільки після пов'язання з «другим» антитілом.

Прямий (метод Кунса) - флюоресцентні антитіла (АТ) + дослідний антиген (АГ)



Непрямий - універсальна флюоресцентна сироватка (ArSv) + специфічні (АТ) + дослідний антиген (АГ)

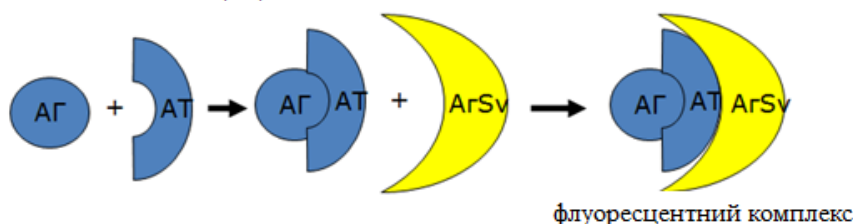
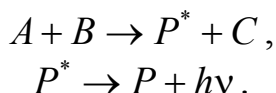


Рис. 2.16. Імунофлюоресцентний аналіз або реакція імунофлюоресценції

Розділ. 3. ХЕМІЛЮМІНЕСЦЕНЦІЯ

3.1. Механізм виникнення хемілюмінесценції

Хемілюмінесценцією називають світіння, що супроводжує хімічні реакції. Наявність такого світіння означає, що енергія, яка виділяється на одній зі стадій хімічного процесу, що протікає в системі, виявляється достатньою для утворення одного з продуктів реакції в електронно-збудженому стані:



Лише у небагатьох із загального числа біологічних реакціях супроводжуються випромінюванням у видимій або ультрафіолетовій областях спектру. Найбільш відомі наступні типи процесів, що супроводжуються світінням.

1. **Мітогенетичне випромінювання** – ультрафіолетове випромінювання широкого діапазону (190 – 325 нм), про яке передбачалося, що воно може виникати при екзотермічних хімічних реакціях, що протікають *in vitro* і в живих системах, та які характеризується дуже малою інтенсивністю. Поглинання молекулами такого слабкого потоку високоенергетичних фотонів приводить до ряду наслідків в живих системах, найбільш важливою з яких є стимуляція клітинних ділень (мітозів).
2. **Біоломінесценція** – яскраве, видиме простим оком світіння деяких бактерій, простих, ракоподібних, черв'яків, молюсків, риб. Біоломінесценція обумовлена певними ферментативними реакціями.
3. **Слабка хемілюмінесценція** (надслабке або власне свічення), супроводжуюча реакції ланцюгового (вільнорадикального, пероксидного) окислення органічних сполук, в основному ліпідів.
4. **Хемілюмінесценція** в системах, що містять активні форми кисню: пероксид водню, супероксидний і гідроксидний радикали, синглетний кисень.
5. **Світіння при реакціях вільних радикалів**, утворених при дії фізичних чинників: при опромінюванні системи іонізуючою радіацією (**радіохемілюмінесценція**); після опромінювання видимим або УФ випромінюванням (**фотохемілюмінесценція**); при пропусканні струму через розчини (**електрохемілюмінесценція**); при дії ультразвуку (**соннолюмінесценція**); при перемішуванні розчинів (**триболюмінесценція**); при опромінюванні швидкими електронами (**катодоломінесценція**).
6. **Термолюмінесценція**. При опромінюванні (або освітленні) речовин в твердій фазі (окремий випадок – при опромінюванні біологічних

об'єктів, заморожених рідким азотом) вільні радикали можуть опинитися іммобілізованими. Їх реакції і супутня хемілюмінесценція активуються при нагріванні і розм'якшенні.

Молекулярний механізм хемілюмінесценції. В даний час відомо досить багато хімічних реакцій, що супроводжуються світінням. В більшості випадків – це досить складні процеси з багатьма проміжними стадіями.

В газах хемілюмінесценція найчастіше спостерігається в екзотермічних реакціях за участю вільних радикалів.

Приклади хемілюмінесценції в розчинах – перегрупування ізомерів похідних бензолу, розкладання пероксидів. При цьому повинна заселятися розпушуюча (збуджена) π^* -орбіталь.

Інтенсивність хемілюмінесценції пропорційна квантовому виходу хемілюмінесценції і швидкості хімічної реакції. **Квантовий вихід хемілюмінесценції** – число випущених квантів на один акт реакції. Утворення збуджених продуктів, що не суперечить закону збереження енергії, можливо при виконанні умови енергетичної достатності $\Delta H_{акт} - \Delta H \geq E_B$, де $\Delta H_{акт}$ – ентальпія активації; ΔH – ентальпія реакції; E_B – енергія збудженого стану продукту реакції.

Утворена збуджена молекула не завжди дезактивується випусканням кванта світла. Квантовий вихід люмінесценції багатьох збуджених продуктів буває низьким. Наприклад, для фосфоресценції з триплетної n, π^* -стану більшості карбонільних сполук ϕ не перевищує $10^{-4} - 10^{-5}$. Тому для посилення інтенсивності хемілюмінесценції часто використовують метод сенсibilізації світіння.

Залежно від того присутні чи ні в реакційній суміші активатори світіння, хемілюмінесценція називається **активованою** або **неактивованою**. Основна вимога до активатора хемілюмінесценції полягає в тому, щоб кінетика реакції була однаковою в присутності і відсутності активатора.

Хемілюмінесценція можлива і з використанням сольватованого електрона. **Сольватований електрон** – електрон, захоплений середовищем в результаті поляризації ним навколишніх молекул (якщо середовищем є вода, електрон називається гідратованим). Вільний електрон починає взаємодіяти з молекулами полярної рідини, що оточують його, до тих пір, поки він не опиниться в потенційній ямі (рис. 3.1), оскільки не зможе подолати електростатичного відштовхування електронної хмари молекули, через яку він проходить. В цьому випадку вільний електрон виявляється в області відносної низької потенційної енергії, тобто в проміжному положенні, що відповідає елементу вільного об'єму в рідині, де він стабілізується близькодійчими силами відштовхування.

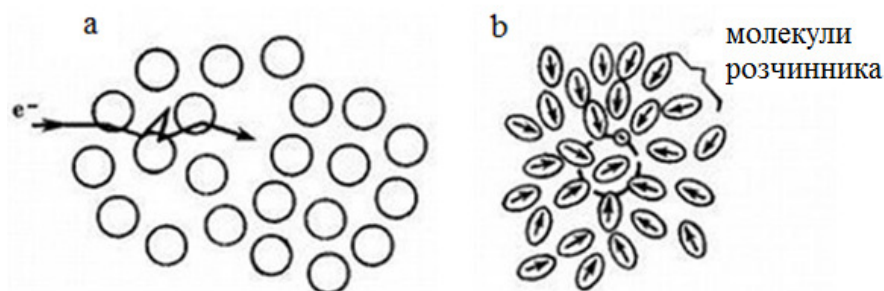
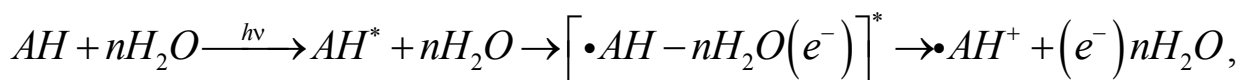


Рис. 3.1 Утворення сольватованого електрона: а – схематичне зображення шляху вільного електрона у рідині; б – орієнтація молекул води навколо сольватованого електрона

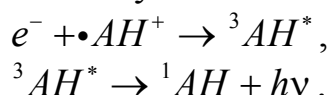
Наприклад, фотоіонізація органічної сполуки під дією ультрафіолетових фотонів відбувається через синглетний збуджений стан молекули і супроводжується захопленням електрона молекулами розчинника:



де AH – органічна молекула $\bullet AH^+$ – катіон-радикал e^- – сольватований електрон.

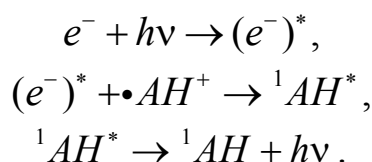
Час переходу електрона з вільного стану в сольватоване при 295 К складає (у пс): 0.24 у воді, 5 в етилен-гліколі, 11 в метанолі, 18 в етанолі, 51 в деканолі, ~ 0.2 в аміаку. При зниженні температури (до температури рідкого азоту 77 К) цей час збільшується.

При невеликому нагріванні спостерігається фосфоресценція молекули, а флуоресценція повністю відсутня:



Це говорить про те, що основний енергетичний рівень сольватованого електрона лежить нижче за триплетний рівень молекули. Перехід сольватованого електрона на S_1 рівень молекули вимагає більшої енергії активації і менш вірогідний.

Сольватований електрон характеризується широкою інтенсивною смугою поглинання у видимій або ІЧ області:



Максимуми смуг поглинання сольватованого електрона різні в різних рідинах: 720 нм (вода), 1850 нм (аміак), 560 нм (етилен-гліколь), 625 нм (метанол), 680 нм (етанол), 2300 нм (діетиловий ефір), 1600 нм (гексан) і так далі.

Залежно від природи середовища і умов утворення сольватований електрон – стабільна або короткоживуча частинка. У розчинах лужних

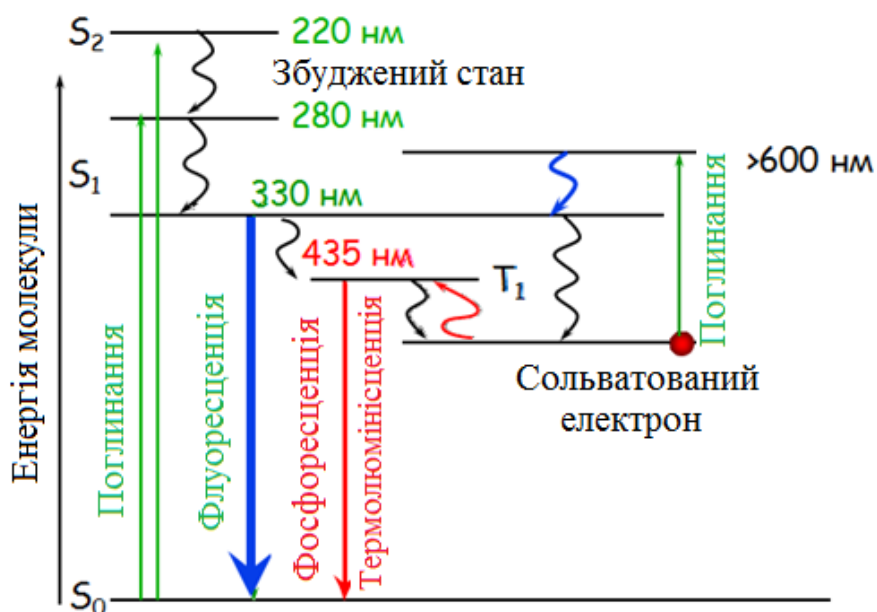


Рис. 3.2. Схема електронних рівнів та електронних переходів за наявності сольватованого електрона

металів в аміаку у відсутності кисню сольватований електрон може зберігатися місяцями, тоді як при радіолізі рідин максимальний час його життя не перевищує тисячних доль секунди.

Емпіричні правила хемілюмінесценції:

1. Спектр хемілюмінесценції подібний до спектру **фосфоресценції**, а не спектру **флуоресценції**. Тобто вірогідніша хемілюмінесценція з триплетного рівня, чим з синглетного.

2. Абсолютна величина квантового виходу в хемілюмінесцентних реакціях має невисокі значення.

3. Енергія фотона, що випускається, дорівнює сумі ентальпії реакції і енергії активації люмінесценції (**правило Одюбера**).

$$h\nu = E_a + \Delta H .$$

3.2. Види хемілюмінесценції

Мітогенетичне випромінювання. Мітогенетичне випромінювання було відкрите в 1923 р. Гуревичем в дослідях з корінцями цибулі. До одного зростаючого корінця цибулі був наближений інший корінець. Кінчик другого корінця був орієнтований перпендикулярно довгій осі першого на деякій відстані від його кінчика, поблизу зони клітинного ділення, що визначає зростання корінця. В результаті на стороні, на яку було направлено дію, частота клітинного ділення зросла, і корінець, відповідно, зігнувся. Склона пластинка між двома корінцями знімала ефект, тоді як кварцова на дію не впливала. Отже, по висновку Гуревича, ефект обумовлений не хімічними діями, а випромінюванням: склом,

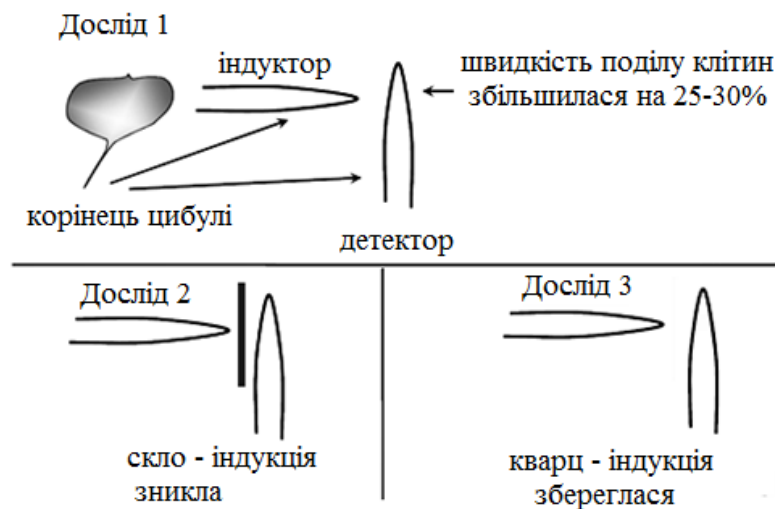


Рис. 3.3. Мітогенетичні промені (досліди Гуревина)

що поглинає, і кварцом, що не поглинає його. Такими властивостями володіє ультрафіолетове випромінювання.

Важливе практичне значення відкритого випромінювання Гуревич продемонстрував при вивченні ракових пухлин. Виявилось, що випромінювання пухлинних кліток сильно відрізняється від випромінювання нормальних, а в крові ракових хворих виявили речовину, здатну пригнічувати мітогенетичне випромінювання нормальних кліток.

У зв'язку з суперечливими результатами експериментального вивчення мітогенетичного випромінювання факт їх існування не є загальноновизнаним. Заперечувати наявність слабого випромінювання в живих організмах неможливо. Його вплив на інші живі організми, як і причини і джерела його генерації, продовжує залишатися предметом наукової суперечки.

Хемілюмінесценція при реакції активних форм кисню.

Активними формами кисню (АФК) є:

- перекис водню (H_2O_2);
- супероксидний аніон-радикал кисню ($O_2^{\bullet -}$);
- радикал гідроксила ($HO^{\bullet}$);
- гіпохлорит (ClO^-).

Значущими джерелами АФК в організмі – клітки-макрофаги (гранулоцити і моноцити крові, а також тканинні макрофаги). АФК, що виділяються активованими макрофагами всередину фагоцитозної везикули, служать цитотоксичними чинниками, що вбивають патогенні мікроорганізми.

В результаті реакції з активними формами кисню може утворюватися синглетний кисень ($^1O_2$ – одна з форм збудженого стану кисню). Далі, синглетний кисень переходить в основний (триплетний) стан з ви-

пусканням кванта світла в ІЧ області:

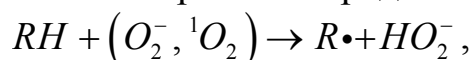


Синглетний кисень здатний також утворювати димери (ексимери), які переходять в основний стан з випусканням квантів з $\lambda = 635, 580$ і 535 нм (видима область спектру).

Хемілюмінесценція при перекисному окисленні ліпідів. Для більшості хемілюмінесцентних реакцій окислення встановлено, що ключовою стадією є розпад проміжних пероксидних сполук.

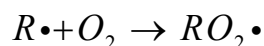
Окислення граничних вуглеводнів (алканів) RH йде по механізму ланцюгової реакції і приводить до утворення гідропероксидних радикалів $ROO\cdot$, рекомбінація яких веде до утворення проміжного продукту – тетраоксиду $ROOOOR$. Тетраоксид, розпадаючись, приводить до утворення збуджених карбонільних сполук (у ряді випадків не можна виключати вірогідність утворення синглетного кисню). На прикладі розпаду ряду тетраоксидів показано, що вихід збуджених триплетів на порядки перевищує вихід збуджених синглетів.

Так перекисне окислення ліпідів починається з реакції ініціації. Ненасичені жирні кислоти (наприклад, лінолева $C_{17}H_{31}COOH$, ліноленова $C_{17}H_{29}COOH$ або арахідонова $C_{19}H_{31}COOH$) взаємодіють з активними формами кисню з утворенням нейтрального радикала ліпиду:

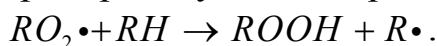


де RH – молекула вуглеводню (жирнокислотний залишок); O_2^- – супероксидний радикал; $^1O_2$ – синглетний кисень; $R\cdot$ – алкільний вільний радикал; HO_2^- – протонірований супероксидний радикал кисню.

Розвиток ланцюгової реакції вільнорадикального окислення виявляється в реакції взаємодії радикала ліпиду $R\cdot$ з киснем з утворенням перекисного вільного радикала $RO_2\cdot$:



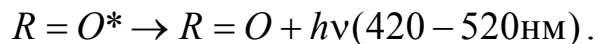
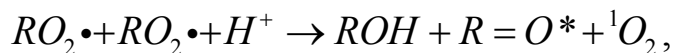
і реакції взаємодії перекисного вільного радикала з $RO_2\cdot$ з ненасиченим ліпідом з утворенням гідроперекису $ROOH$ і радикала ліпиду $R\cdot$:



Стаціонарна концентрація перекисних радикалів ненасичених жирних кислот $RO_2\cdot$ невелика. Концентрація тих, що накопичуються в процесі $ROOH$ служить одним і показників інтенсивності перекисного вільнорадикального окислення. Гідроперекис $ROOH$ здатний розпадатися і давати почало утворенню нових радикалів, що приводить до розгалуження ланцюга. У теж час частина радикалів $RO_2\cdot$ і $R\cdot$ між собою рекомбінують з утворенням неактивних продуктів:

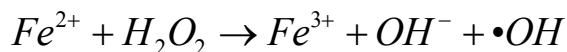
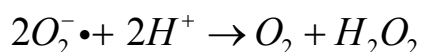
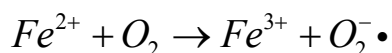


В результаті реакції між перекисними радикалами $RO_2\bullet$ виникають молекулярні продукти у збудженому стані $R=O^*$. Перехід $R=O^*$ в основний стан $R=O$ супроводжується випромінюванням квантів світла:

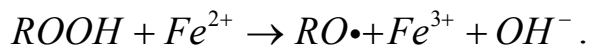


Утворення електронно-збуджених станів у ряді випадків може здійснюватися в результаті переносу електрона між аніон- і катіон-радикалами. Перенос електрона відбувається тільки за умови ізоенергетичності рівнів електрона в аніон-радикалі і утвореній нейтральній збудженій молекулі. При цьому сольватна (або гідратна) «шуба» електрона знижує його енергію. Якщо немає ізоенергетичності, то надлишок енергії повинен перейти в енергію коливань ядер ($10^{-3}-10^{-12}$ с – період коливань), «розгойдати» які за час переносу електрона (10^{-16} с) неможливо, тому перенос не відбудеться. Внаслідок ізоенергетичності електронних переходів може відбуватися акцептація електрона як із збудженого π^* -, так і з незбудженого π -уровней. Відповідно електрон передається на вільну збуджену π^* - або незбуджену π -орбіталь утвореної нейтральної молекули. Тому в реакції можливе утворення збуджених молекул як донора електрона, так і акцептора електрона.

Регулюючу роль в перекисному окисленні ліпідів грають **іони металів змінної валентності**. Наприклад, іони двовалентного заліза Fe^{2+} . Залізо грає дуже важливу роль в організмі людини і тварин; від нього залежить транспорт (гемоглобін), зберігання (міоглобін), і використання (цитохроми, цитохромоксидаза, негемові залізо-місткі білки) кисню для дихання. Воно також є абсолютно необхідним компонентом активних центрів багатьох ферментів (аконітаза, пролін-гідроксилаза), включаючи фермент антиоксидантного захисту – каталазу. Залізо здатне з великою швидкістю акцептувати і віддавати електрони, перетворюючись, відповідно, в двовалентну (Fe^{2+}) або тривалентну (Fe^{3+}) форми. Саме ця здатність заліза робить його абсолютно необхідним компонентом вказаних вище білків. Окислювально-відновна здатність заліза сприяє активації появи вільних радикалів - гідроксильного і супероксидного радикалів.



і розгалуженню ланцюга

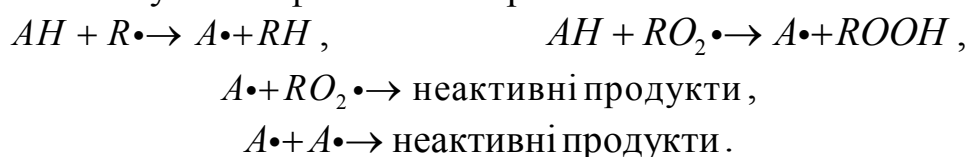


Вільні низькомолекулярні і ліпідні радикали, що в результаті нако-

пичуються, можуть пошкоджувати практично всі органічні молекули (білки, ліпіди, нуклеїнові кислоти і так далі) і всі біологічні структури

Живі організми захищені від оксидативного стресу і пошкоджень, що каталізують залізом, за допомогою двох механізмів. По-перше, щоб запобігти вільно-радикальній атаці, залізо зв'язується білками. По-друге, для запобігання надмірному захопленню заліза в місцях зберігання, в організмі існують тонкі механізми його регуляції, накопичення і зберігання.

Для регулювання процесу перекисного окислення жирів і людина, і природа використовують **антиоксиданти**. У харчові продукти з цією метою додають пропілгалат, бутильований гідроксианізол і бутильований гідрокситолуол. До природних антиоксидантів відносяться жиророзчинний вітамін *E* (α -токоферол), а також вітамін *C* і водорозчинні урати. Антиоксиданти діляться на два класи: 1) превентивні антиоксиданти, що знижують швидкість ініціації ланцюгової реакції, і 2) антиоксиданти, що гасять (переривають ланцюг), перешкоджають розвитку ланцюгової реакції. До перших відносяться каталаза та інші пероксидази, руйнуючі *ROOH*, і агенти, що створюють хелатні (кешнеподібні внутрішні) комплекси з металами, – ДТПА (диетилентриамінпентаацетат) і ЕДТА (етилендіамінтетраацетат). Як антиоксиданти (*A*), що переривають ланцюг, часто виступають феноли або ароматичні аміни:



В умовах *in vivo* головними антиоксидантами, що переривають ланцюг, є супероксиддисмутаза, яка у водній фазі уловлює супероксидних вільних радикалів O_2^- , а також вітамін *E*, що уловлює вільних радикалів $RO_2\bullet$ у ліпідній фазі.

Причини надзвичайно низької інтенсивності власної хемілюмінесценції клітин і тканин («надслабке світіння»):

1. Концентрація вільних радикалів в біологічних системах порівняно мала, оскільки вільні радикали – високореактивні сполуки. В результаті швидкості тих реакцій, в ході яких відбувається світіння, невисокі.

2. Не у 100% випадків взаємодії вільних радикалів утворюються електронно-збуджені молекули продуктів реакції.

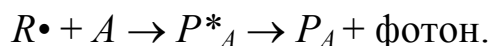
3. Немає 100% вірогідності того, що електронно-збуджена молекула віддасть надлишок енергії у формі світлового кванта. Ця енергія може просто розсіятися у формі тепла.

Активована хемілюмінесценція. Існують хімічні і фізичні активатори хемілюмінесценції.

Хімічні активатори – речовини, здатні взаємодіяти з вільними радикалами. В результаті утворюються відповідні продукти, що знаходяться в електронно-збудженому стані. У результаті, в системі, разом із збудженими продуктами взаємодії між вільними радикалами, з'являються ще і збуджені продукти реакції між вільними радикалами і хімічними активаторами.

Завдяки цьому, збільшується частка збуджених молекул по відношенню до загального числа молекул.

В результаті світіння стає інтенсивнішим.



Тут $R\bullet$ – вільний радикал, A – хімічний активатор, P^*_A – продукт перетворення хімічного активатора у збудженому стані (забезпечує хемілюмінесценцію), P_A – продукт в основному (незбудженому) стані

Приклади хімічних активаторів хемілюмінесценції (**хемілюміногенних зондів**):

1) Люмінол (3-амінофталевий гідразид) – забезпечує інтенсивне світіння в присутності $HO\bullet$ (вільний радикал гідроксиду). Підсилює хемілюмінесценції в 70 разів.

2) Люцигенін (біс-N-метилакридинієва селітра) – забезпечує інтенсивне свічення в присутності $O_2^-\bullet$ (супероксидний аніон-радикал кисню).

Фізичні активатори. Ці молекули не вступають в хімічні реакції з вільними радикалами. У основі посилення ними хемілюмінесценції лежить фізичний перенос енергії з молекули продукту хемілюмінесцентної реакції на молекулу активатора:



Тут P^* – продукт хемілюмінесцентної реакції у збудженому стані, B – фізичний активатор в основному (незбудженому) стані, B^* – фізичний активатор у збудженому стані.

Приклади фізичних активаторів хемілюмінесценції (для реакцій вільнорадикального окислення ліпідів, тобто детекція вільних радикалів ліпідів – $R\bullet$, $RO\bullet$ і $ROO\bullet$):

1) Родамін – підсилює хемілюмінесценцію в 37 разів;

2) Кумарін С-525 - підсилює хемілюмінесценцію в 1500 разів. При цьому на величину хемілюмінесценції не впливає присутність активних форм кисню.

3.3. Біоломінесценція

Біоломінесценція – здатність живих організмів світитися, що досягається самостійно або за допомогою симбіонтів. Назва походить від *др.-греч.* βίος, «життя» і *лат.* lumen — «світло». Світло створюється у

більш високорозвинутих організмах в спеціальних органах (наприклад, у фотофорі риб), що світяться, у одноклітинних еукаріот – в особливих органоїдах, а у бактерій – в цитоплазмі. Біоломінесценція буває внутріклітинна або секреторного типу. У останньому випадку компоненти біоломінесцентної реакції «викидаються» з організму у вигляді слизу, що покриває його, або розпливаються навколо нього у воді, як велика світлова хмара. Біоломінесценція ґрунтується на хімічних процесах, при яких енергія, що звільняється, виділяється у формі світла.

Історія вивчення. Вивчення природи біоломінесценції бере свій початок в 1668 році, коли Роберт Бойль, що вивчав процеси горіння, виявив схожість між процесами горіння вугілля і свіченням гнилиць. Бойль, використовуючи вакуум, продемонстрував, що в обох випадках світіння зникає, якщо видалити повітря (тобто кисень).

Рафаель Дюбуа, що поставив експеримент (1887) з екстрактами зі світляків *Rugophagus*, виявив, що екстракт тканин фотофорів світляків, отриманий гомогенізацією в холодній воді, світиться протягом декількох хвилин, проте екстракт, приготований в гарячій воді, не світиться. Разом з тим Дюбуа виявив, що якщо додати до вимерлого холодного екстракту порцію гарячого екстракту, що не світиться, то світіння поновлюється. Таким чином, за світіння були відповідальні дві фракції: стійка до нагріву низькомолекулярна, і білкова, така, що втрачає активність при нагріванні. Світіння *in vitro* виникало тільки у присутності обох фракцій і в присутності кисню. Аналогічні результати Дюбуа отримав і при експерименті з двостулковими молюсками *Pholas dactylus*, що світяться. Така поведінка типова для систем «фермент – субстрат», тому Дюбуа назвав субстратну фракцію **люциферин**ом, а білкову – **люциферазою** і постулював ферментативну природу реакцій, що викликають біоломінесценцію.

Загальні риси біоломінесценції. Таким чином, біоломінесцентні реакції є, як правило, окисленням деякої речовини, що названа люциферином, киснем повітря та спеціальним ферментом-каталізатором люциферазою. Під час такого ферментативного окислення люциферину виділяється велика кількість енергії (167–334 кДж/моль), що переводить проміжний продукт цієї реакції в збуджений стан.

Назви люцифераза і люциферин – умовні. В різних організмів, що світяться, ці ферменти і субстрати не схожі по своїй хімічній будові. В даний час відомо близько 30 типів люцифераз і відповідних їм люциферинів. У деяких організмів, що світяться, за світіння відповідальні стійкі люциферин-люциферазні комплекси – фотопротеїни. В таких комплексах люциферин тимчасово (до моменту випромінювання кванта) або навіть постійно злитий в одне ціле з люциферазою.

Для здійснення більшості біоломінесцентних реакцій, що протікають в декілька стадій, окрім кисню, необхідні такі з'єднання як АТФ, альдегіди, піридиннуклеотиди, флавіни, перекиси, іони металів. Ферменти, що беруть участь в біоломінесцентній реакції, виконують якісно різні функції. Квантовий вихід біоломінесценції (відношення числа випущених квантів до молекул, що прореагували), є високим і варіюється в діапазоні 0.1 – 1.0. Такі квантові виходи для реакцій, що протікають у водних розчинах при нейтральних значеннях рН, незвичайні для хемілюмінесцентних процесів і обумовлені специфічною ферментативною природою окислювальних реакцій біоломінесценції, що каталізують люциферазними комплексами.

Багатьом біоломінесцентним реакціям для випромінювання світла окрім основних компонентів потрібний ще додатковий низькомолекулярний «учасник». Наприклад, для ефективного протікання біоломінесцентної реакції світляків потрібні іони магнію.

Весь цикл перетворень в ході біоломінесцентної реакції умовно розбивається на чотири стадії.

1. Утворення проміжних фермент-субстратних комплексів (інтермедіатів).
2. Елементарний акт збудження і перехід деякого інтермедіата в емітер.
3. Випускання кванта світла.
4. Релаксація люциферази в початковий стан.

Фізико-хімічні механізми біоломінесценції. У реакціях біоломінесценції, енергія, що виділяється, не розсівається у вигляді тепла, як це відбувається в ході більшості екзотермічних хімічних реакцій, а витрачається на утворення одного з продуктів реакції в збудженому електронному стані. Для випромінювання світла в ході хемілюмінесцентної реакції необхідне виконання, як мінімум, двох **умов**:

- 1) енергія, що виділяється в ході реакції, повинна перевищувати $\sim 167\text{--}334$ кДж/моль;
- 2) різниця енергій основного і збудженого стану продукту реакції повинна бути нижче ентальпії хімічної реакції.

При дотриманні цих умов можливе утворення з достатньо високим виходом окисленої форми люциферину у збудженому стані і подальший перехід в основний стан з випусканням фотона видимого спектрального діапазону.

Довжина хвилі випромінюваного при біоломінесцентних процесах світла залежить від різниці енергій основного і збудженого станів окислених форм люциферинів, напівширина смуги випромінювання складає зазвичай ~ 50 нм. Оскільки процес переходу збуджений — основний

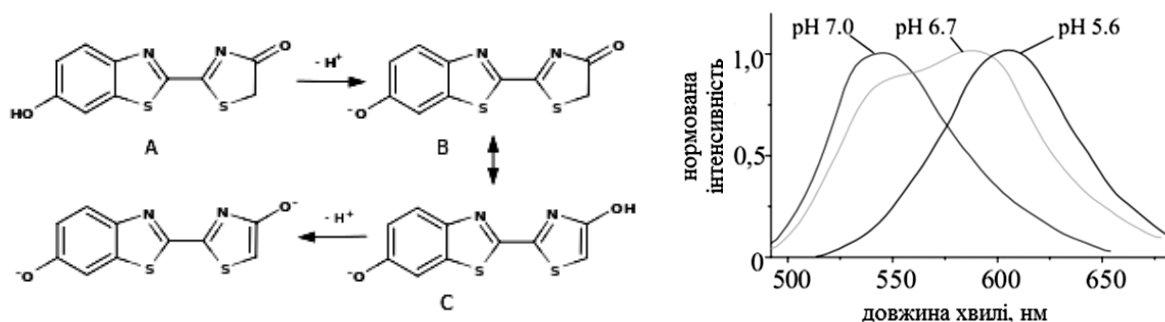


Рис 3.4. а) Різні форми оксилюциферина комах:

A – нейтральна кетоформа $\lambda_{\text{max}} = 618 \text{ нм}$

B – аніон (фенолят) кетоформи

C – аніон енольної форми, $\lambda_{\text{max}} = 587 \text{ нм}$

D – енолят-дианіон, $\lambda_{\text{max}} = 556 \text{ нм}$

б) Спектри випромінювання біоломінесцентної реакції світлячків при різних значеннях рН

стан обернемо, то спектри флуоресценції оксилюциферинів близькі до спектрів біоломінесценції: у обох випадках випромінює молекула оксилюциферина, переведена в збуджений стан або внаслідок хімічної реакції (біоломінесценція), або внаслідок поглинання достатньо енергетичного фотона.

На біоломінесценцію впливає **ряд чинників**.

Максимум в спектрі випромінювання в біоломінесцентних процесах може змінюватися залежно від умов протікання реакції (**перший чинник**). Так, не дивлячись на те, що хімізм біоломінесценції жуків-світлячків однаковий і структури люциферину і оксилюциферина різних видів ідентичні, колір світіння може варіювати від зеленого до червоного, тобто максимум в спектрі випромінювання може змінюватися від 490 до 622 нм. Більш того, у личинок бразильських жуків-фенгонід роду *Phrixothrix* є декілька органів-фотофорів, що випускають світло різних відтінків, – червоного фотофорів голови і жовто-зеленого фотофорів черевця. Така зміна спектру випромінювання можлива, коли оксилюциферин може існувати в декількох формах з різною енергією основного стану, що, в свою чергу, відповідають різним енергіям переходу із збудженого стану і, внаслідок цього, різним максимумам в спектрі випромінювання при переході із збудженого стану в основний.

Оксилюциферин світлячків здатний до кето-енольної таутомерії і в розчинах існує у вигляді суміші кетонної і енольної форм (рис. 3.4). Відношення кількостей кето- і енольного таутомерів залежить від рН середовища: у слаболужних умовах (рН 7.5 – 7.8 і вище) переважає енольная форма, при цьому максимум в спектрі біоломінесценції приходить на 587 нм (жовто-зелена область), при закисненні середовища (рН < 6) переважаючою стає кетонна форма і максимум в спектрі випроміню-

вання зрушується в довгохвильову область до 618 нм (червона область). При підлюговуванні середовища утворюється енолят-аніон оксильоциферина, і максимум в спектрі зміщується в короткохвильову область до 556 нм. При проміжних значеннях рН в розчині присутня суміш обох форм і спектр випромінювання виявляється бімодальним, що сприймається оком внаслідок адитивного зсуву жовто-зеленого і червоного світла проміжний відтінок.

Другим чинником, що впливає на спектр біоломінесценції, являється мікрооточення молекули оксильоциферина в основному і збудженому станах. На значення енергетичних рівнів основного і збудженого станів молекули оксильоциферина в середовищі впливає і енергія їх взаємодії з розчинником (енергія сольватації), і утворення водневих зв'язків: чим сильніше збуджена молекула асоційована з мікрооточенням і чим вище його поляризація, тим нижче енергія збудженого стану, тим менше енергія фотона, що випускається, і тим сильніше зрушення максимуму спектру випромінювання в довгохвильову область.

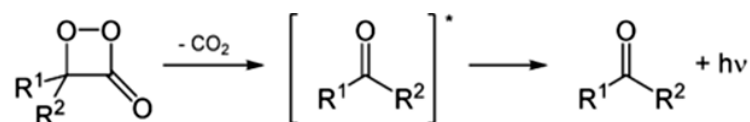
Третім чинником, що впливає на енергію збудженого стану оксильоциферина і, відповідно, спектральний максимум, є релаксаційні процеси мікрооточення. При відщепленні CO_2 від 1,2-диоксетанового попередника оксильоциферина світляків походить дуже швидка перебудова електронної структури молекули і різка зміна її дипольного моменту при цьому збуджена молекула опиняється в сольватній оболонці молекули-попередниці. Час життя молекули оксильоциферина в збудженому синглетному стані складає $\sim 10^{-9} - 10^{-8}$ с. Якщо за цей час молекули розчинника або оточуючі активний центр білкові ланцюги люциферази не встигають переорієнтуватися в новий рівноважний стан, то енергія збудженого стану оксильоциферину виявляється максимальною, а максимум спектру зміщений в короткохвильову область. Тобто довжина хвилі випромінюваного світла залежить від швидкості релаксації мікрооточення і в тому числі від рухливості білкових ланцюгів люциферази.

Четвертим чинником, що приводить до зміни спектру біоломінесценції, є перевипромінювання енергії, що виділяється при окисленні люциферинів, флуоресцентними білками – такий механізм спостерігається у деяких люмінесцентних бактерій і медуз, і приводить до зсуву спектрального максимуму в довгохвильову область. У бактерій, в клітках яких присутній жовтий флуоресцентний білок (YFP *англ.* yellow fluorescent protein) передбачається індуктивно-резонансний міжмолекулярний перенос енергії (механізм Ферстера) від люциферин-люциферазного комплексу до флуоресцентного білка. Цей механізм може грати вельми істотну роль і ставати основним механізмом біоломінесценції: було показано, що *in vitro* при додаванні до целентеразинової люциферин-люциферазної системи полипов-альціонарій Renilla

reniformis, з максимумом випромінювання 480 нм, зеленого флуоресцентного білка GFP квантовий вихід люмінесценції на довжині хвилі 510 нм підвищується в три рази.

Типи люциферин-люциферазних систем. Необхідною умовою біоломінесценції є висока ентальпія реакції окислення люциферину: енергія, що виділяється в ході реакції повинна перевищувати $\sim 41\text{--}71.5$ ккал/міль (відповідає енергіям електромагнітного випромінювання у видимому діапазоні $\sim 400\text{--}700$ нм), ця енергія сумірний з енергією зв'язку C-C в алканах (~ 79 ккал/міль). Такий енергетичний ефект значно перевищує енергетичні ефекти більшості біохімічних реакцій – у тому числі і з участю макроергичних сполук-носіїв енергії в живих системах; так, наприклад, енергія, що вивільняється при гідролізі АТФ до АМФ складає 10.9 ккал/міль.

Найбільш поширений реакційний механізм біоломінесценції: відщеплення CO_2 від диоксетанона – проміжного продукту окислення люциферину



веде до утворення оксилюциферина у збудженому стані, який переходить в основний стан з випромінюванням світла.

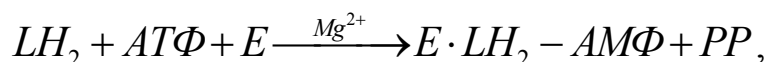
Більшість люциферинів при окисленні утворюють циклічні напружені проміжні пероксиди – диоксетанони. Такі сполуки далі розпадаються з виділенням молекули вуглекислого газу і утворенням збудженого кетона-люциферину. Такий механізм реакції характерний для окислення люциферину комах і целентеразинів – люциферинів багатьох морських організмів.

В даний час відомо п'ять класів люциферинів різної хімічної природи:

- 1) альдегід-флавінова система бактерій;
- 2) альдегідні люциферини черв'яків;
- 3) тетрапіроли динофлагеллят і деяких ракоподібних;
- 4) імідазопіразоли різних морських організмів;
- 5) люциферин комах – похідне тіазолу.

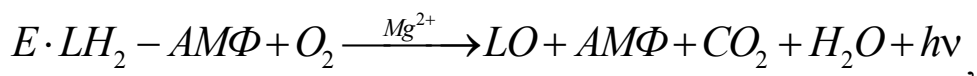
Біоломінесценція світляків. Люциферази різних видів світляків трохи відрізняються за будовою і складом амінокислот, максимумом довжини хвилі випромінюваного світла (554–582 нм) і іншими параметрами. Але, не дивлячись на це, всі вони каталізують один і той же хімічний процес – реакцію окислення киснем повітря люциферину (LH_2) в присутності АТФ і іонів Mg^{2+} . На першій стадії відновлений люциферин

реагує з АТФ за участю люциферази і іонів магнію. При цьому утворюються люцифериладенілат, зв'язаний каталітичним центром люциферази, і пірофосфат:



де E – люцифераза, LH_2 – люциферин, $AT\Phi$ – аденозинтрифосфат, $AM\Phi$ – аденозинмонофосфат, PP – пірофосфат.

На другій стадії люцифериладенілат, що є активним компонентом біоломінесцентної реакції, взаємодіє з молекулярним киснем (на цьому етапі АТФ і іони магнію участі в реакції не приймають). Продукти окислення переходять в електронно-збуджений стан, і повернення їх в основний стан супроводжується біоломінесценцією у видимій області спектру:



де LO – оксилюциферин, CO_2 – вуглекислий газ.

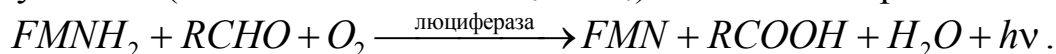
Біоломінесценція кишковопорожнинних. Біоломінесценція багатьох видів морських кишковопорожнинних (гідромедуз) обумовлена специфічними білками, що є стійким комплексом люциферази з люциферином. Ці білки називають Ca^{2+} -активними (або кальцій-залежними) **фотопротейнами**. Фотопротейни складаються з невеликого одноланцюгового поліпептиду-апопротейна, люциферину і молекули кисню. Люциферином кишковопорожнинних є целентеразин – гетероциклічна сполука з досить складною структурою, похідне імідазолпіразіна.

Целентеразин окислюється молекулярним киснем до стану гідроперекису при приєднанні до апопротейну. Біоломінесценція такої системи виникає при появі іонів кальцію, що змінюють конформацію білка так, що він втрачає зв'язок з перекисом люциферину. Перекис при цьому втрачає стабільність і перетворюється на оксид, попутно відокремлюючи CO_2 і випускаючи синє світло. Фотопротейни на відміну від люцифераз здатні здійснювати тільки один каталітичний акт: при взаємодії з іонами кальцію вся закумульована в комплексі енергія випромінюється у вигляді квантів світла.

Біоломінесценція бактерій. Кисень грає дуже важливу роль в життєвому циклі бактерій, що світяться. Ці бактерії є облігатними аеробами по свіченню. Дуже малих концентрацій кисню виявляється достатньо, щоб бактерії почали світитися, тому їх навіть використовують як один з найвідчутніших індикаторів кількостей слідів кисню (від 10^{-10} до 10^{-5} М). Синтез люциферази в клітках бактерій, що світяться, залежить також від концентрацій в середовищі O_2 . Та і сама люцифераза володіє високою спорідненістю до кисню.

Другий метаболічний процес, на який бактерії, що світяться, витрачають кисень, – дихання. Причому розподіл споживання O_2 між процесами світіння і дихання залежить від умов зростання бактерій. Так, у фазі сповільненого зростання бактерій спостерігається їх максимальне світіння завдяки тому, що на це йде майже весь кисень, що поглинається.

Хімічною основою світіння бактерій є ферментативне окислення відновленого флавінмононуклеотида $FMNH_2$ і довголанцюгового альдегіду $RCHO$ (довжина ланцюга $C_{10} - C_{14}$) киснем повітря:

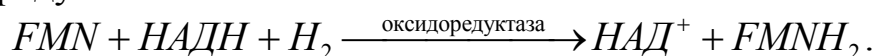


Продуктами є флавінмононуклеотид FMN і жирна кислота $RCOOH$.

Бактерійна біolumінесценція спостерігається в блакитній області спектру ($\lambda = 490$ нм), і інтенсивність її залежить від кількості люциферази і субстратів ($FMNH_2$ і $RCHO$). На кожен квант біolumінесценції використовуються дві молекули $FMNH_2$ і одна молекула аліфатичного альдегіду.

Тепловий ефект реакції складає 110 ккал/міль. Він складається з теплот окислення $FMNH_2$ (40 ккал/міль) і альдегіду (70 ккал/міль). Сумарний тепловий ефект реакції перевершує енергію кванта біolumінесценції, рівну приблизно 60 ккал/міль. В той же час видно, що окислення тільки відновленого флавіну енергетично недостатньо для випромінювання спостережуваного кванта світла.

Бактерії мають спеціальні ферментативні системи, сприяючі відновленню FMN і карбонової кислоти виключно для потреб біolumінесценції. Вважається, що відновлення FMN в бактеріях відбувається в реакції, що каталізує відновленим нікитинамідаденіндинуклеотидом $НАДН$, FMN -оксидоредуктазою:



Застосування біolumінесценції. Три основні *переваги* застосування біolumінесценції для аналізу.

1. Висока чутливість сучасних методів детектування випромінювання в оптичному діапазоні. Це означає теоретичну можливість вимірювати одиничні молекулярні події. У реальності перешкоджають різного роду шуми.

2. Можливість використання ланцюгів сполучення інших ферментів з люциферазою. Можливість штучно будувати ланцюги зв'язаних ферментів таким чином, що концентрація більшості ключових метаболітів може бути виміряна через біolumінесценцію.

3. Висока специфічність і чутливість біоломінесцентних методів визначається фермент-субстратною взаємодією.

Основні напрями застосування біоломінесцентних реакцій, отриманих з різних організмів, що світяться:

1. Аналіз субстратів люцифераз.
2. Моніторинг АТФ.
3. Визначення змісту іонів кальцію.
4. Імуноаналіз.
5. Біоломінесцентні репортерні гени.
6. Біоломінесцентна візуалізація.

Розділ 4. ФОТОБІОЛОГІЧНІ ПРОЦЕСИ

4.1. Загальні особливості

Під дією поглинених фотонів, ультрафіолетової, видимої і інфрачервоної областей спектру, в живих організмах протікають процеси, які називають *фотобіологічними*. До фотобіологічних відносять процеси, що починаються з поглинання кванта світла біологічно важливою молекулою і закінчуються якою-небудь фізіологічною реакцією (позитивною або негативною). До таких процесів відносяться:

- фотосинтез – синтез органічних молекул за рахунок енергії сонячного світла;
- фототаксис – рух організмів до світла або від нього;
- фототропізм – поворот листя або стебел рослин до світла або від нього;
- зір – перетворення світлової енергії на енергію нервового імпульсу у фоторецепторах;
- дія ультрафіолетових променів (бактерицидна, мутагенна, канцерогенна, синтез вітаміну D, еритемна, утворення засмаги, терапевтичний ефект).

Фотобіологічні процеси схожі по своїй схемі і складаються з декількох етапів:

- 1) *фотофізична стадія*: поглинання кванта світла речовинами; внутрішньо-молекулярний розмін енергії (міграція електронно-збудженого стану по молекулі і локалізація в певній ділянці молекули); міжмолекулярний перенос енергії.
- 2) *Фотохімічна стадія*: хімічні перетворення, що індукуються фотофізичною стадією процесу і приводять до виникнення первинних фотопродуктів (первинний фотохімічний акт, темнові реакції); біохімічні реакції за участю фотопродуктів.

Фотопродукти, беручи участь в біохімічних або молекулярно-біологічних явищах, визначають біологічну реакцію клітини або багатоклітинного організму на дію світла.

Первинний фотохімічний акт – це процес, в який вступає молекула з нижнього синглетного S_1 або триплетного T_1 збудженого стану.

В ході еволюції в різних організмах сформувалися спеціальні речовини, що поглинають світло, – *пігменти*, роль яких пов'язана з виконанням корисних для життєдіяльності організмів світлозалежних функцій. У клітинах присутні білки і нуклеїнові кислоти, які поглинають світло в ультрафіолетовій області. При цьому можуть розвиватися фотобіологічні процеси, які негативно впливають на організм (наприклад, фотоінактивація кліток – пошкодження ультрафіолетовими променями).

Тому в ході еволюції виникли пігменти, які можуть захищати клітки від фотоінактивації.

Пігменти біологічних систем. По функціональному значенню їх можна розділити на групи:

1. **Фотосинтетичні пігменти** беруть участь у фотобіологічних процесах, що є функціонально значущими в життєдіяльності організму (хлорофіл зелених рослин, каротиноїди, ксантофілли, родопсин, фітохром, криптохром).
2. **Пігменти**, в молекулах яких є хромофорні групи, що вибірково поглинають світло видимої області спектру (пігмент крові – гемоглобін, хромопротеїд м'язів – міоглобін, окислювально-відновні ферменти – каталаза, пероксидаза, цитохроми рослинних і тваринних тканин, хлорокриарин – здійснює дихання у безхребетних).
3. **Екрануючі пігменти** виконують функцію екранування світлочувливих кліток і тканин (меланіни, каротиноїди, флавоноїди).
4. **Пігменти морфолого-приспосувального значення** додають певне забарвлення різним частинам організму, забезпечують для тварин маскування і статевий відбір, а для рослин – залучення комах-обпилювачів (флавіни, птеридіни, ціанідини, меланіни, антоціани).

Хромофори – ненасичені групи атомів, що обумовлюють колір хімічної сполуки і що в той же час поглинають електромагнітне випромінювання незалежно від наявності забарвлення. Так, карбонільна група $C=O$ є хромофором, що поглинає в області 280 нм, в той же час кетон, $C=O$, що містять, – безбарвні речовини. До хромофорів відносять нітрогрупу $-N=N-$, нітрогрупу $-NO_2$, нітрозогрупу $-N=O$, карбонільну групу $>C=O$, зв'язані системи подвійних зв'язків, хіноїдні угруповання та ін.

Для багатьох пігментів характерна близька хімічна будова. Так в основу фотосинтетичних пігментів, дихальних цитохромів, окислювально-відновних ферментів складає порфірин – замкнутий цикл з чотирьох пірольних кілець. Жовті, помаранчеві і червоні рослинні пігменти – похідні ароматичні сполуки типу флавонона.

Типи фотобіологічних процесів. По біологічній дії їх розділяють на фотофізіологічні і фотодеструктивні.

Фотофізіологічні процеси забезпечують протікання пов'язаних зі світловою дією фізіологічних функцій організму. Їх можна розділити на:

- **процеси енергозапасання**, при яких енергія поглинених фотонів перетворюється на інші форми вільної енергії;
- **процеси регуляції**, при яких світло (навіть у невеликих кількостях) визначає напруженість ряду фізіологічних функцій;

- **фотобіосинтетичні процеси**, що викликають утворення на світлі ряду біологічно важливих речовин.

При поглинанні фотонів в таких процесах не відбувається яких-небудь пошкоджень макромолекул.

Фотодеструктивні процеси, що полягають у виникненні під дією світла пошкоджень біомакромолекул (білків, нуклеїнових кислот і ін.). Вони можуть супроводжуватися загибеллю клітин, виникненню мутацій, порушенням фізіологічних функцій організму.

Одне із завдань при вивченні фотобіологічних процесів – визначення речовини, яка поглинає діюче випромінювання, і тим самим бере участь в перших стадіях процесу. Для цього вивчають спектр фотохімічної дії і порівнюють його із спектрами поглинання передбачуваних учасників реакції.

Спектр дії фотобіологічного процесу – залежність деякого кількісного показника процесу від довжини хвилі випромінювання. Спектр дії необоротної однофотонної фотохімічної реакції співпадає із спектром поглинання фотохрому.

Завдання дослідження спектрів дії

- **Виявлення діапазону довжин хвиль**, в якому випромінювання найефективніше викликає даний фотобіологічний процес. Необхідно для підбору ефективних джерел світла при практичному застосуванні фотобіологічних процесів.
- **З'ясування природи молекул-акцепторів** діючих фотонів. Для цього необхідно вибирати такий кількісний показник процесу, який був би пов'язаний простою залежністю з тим або іншим показником поглинання світла молекулою-акцептором

Якщо спектр дії фотохімічної реакції не співпадає формою із спектром поглинання або квантовий вихід продукту залежить від довжини хвилі, то механізм реакції відрізняється від однофотонного необоротного.

Приклади:

1. Спектр (рис. 4.1, крива 1) фотоінактивації трипсину (фермент класу гідролаз, що розщеплює пептиди і білки) близька до спектру поглинання (крива 2) його головних хромофорів (залишки триптофану, тирозину і цистину).
2. Крива загибелі бактерій під дією ультрафіолету має максимум в області 265 нм і схожа із спектром поглинання нуклеїнових кислот.
3. Спектр дії фотосинтезу (рис. 4.2) типового фотосинтезуючого організму формою повторює сумарний спектр поглинання його основних (хлорофіли, бактеріохлорофіли) і допоміжних пігментів (каротиноїди, фікобіліни).

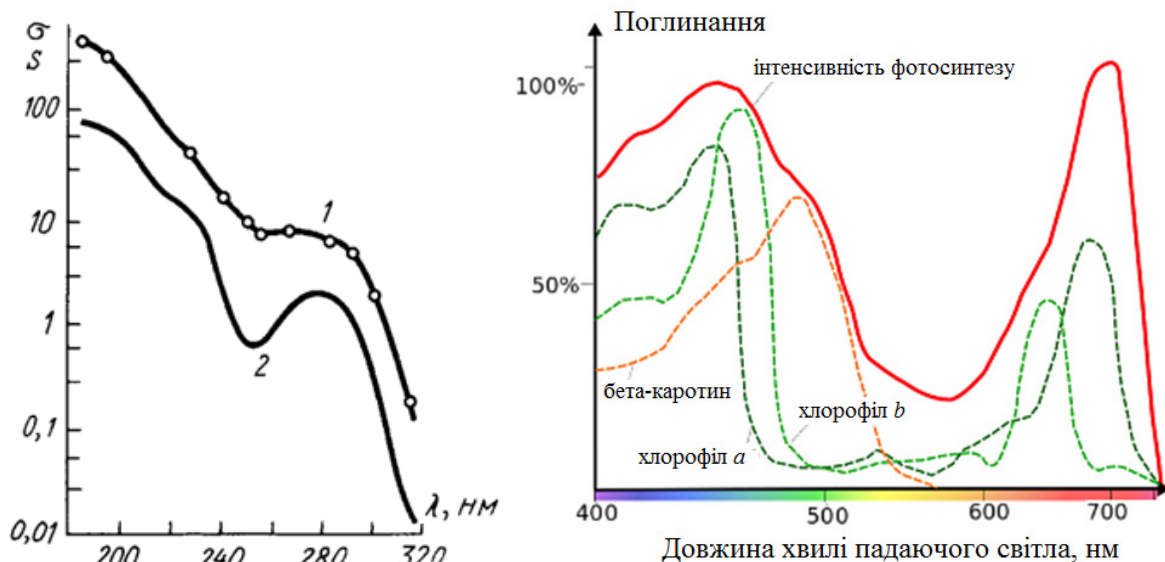


Рис. 4.1. а) Спектри дії фотоінактивації (1) і спектр поглинання трипсину (2);
б) спектри поглинання хлорофілів і каротиноїдів та спектр дії фотосинтезу

4.2. Фотохімічні процеси

Загальна характеристика. Поглинаючи квант світла, молекула отримує додаткову енергію, і на її орбіталях з'являються одиночні електрони з підвищеною хімічною активністю. Це може приводити до індукції **фотохімічних** реакцій, які в темноті не відбуваються. Фотохімічна реакція володіє високою селективністю, оскільки квант світла даної довжини хвилі активує окремий зв'язок або групу атомів в молекулах, що поглинають світло.

Закони фотохімії.

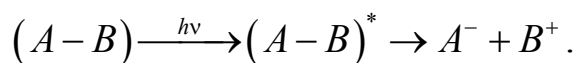
1. **Закон Гротгуса-Дрепера.** Фотохімічні зміни в системі відбуваються тільки під впливом поглиненого світла.
2. **Закон Ейнштейна фотохімічній еквівалентності.** Кожен поглинений в первинному акті квант світла здатний активізувати тільки одну молекулу.
3. При поглинанні кванта світла молекулою органічної речовини є певна вірогідність виникнення самого нижнього збудженого синглетного або триплетного стану, які і беруть участь в протіканні фотохімічних реакцій.

Ефективність фотохімічних реакцій характеризується **квантовим виходом фотохімічної реакції** – число молекул, яке піддалося перетворенню, з розрахунку на один поглинений квант світла. Квантовий вихід зазвичай розраховується для первинного фотохімічного процесу. Швидкість дезактивації електронно-збудженого стану молекул велика порівняно зі швидкостями звичайних хімічних реакцій. Тому швидкості фо-

тохімічних реакцій зі збудженими молекулами достатньо високі.

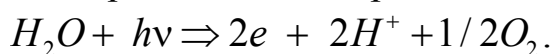
Елементарні фотохімічні реакції.

1. **Фотодисоціація і фотоіонізація** – структурні перебудови в молекулі, що поглинула світло:

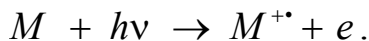


Ключова відмінність між фотодисоціацією і фотоіонізацією: фотодисоціація – це руйнування хімічної сполуки із-за активності фотонів, тоді як фотоіонізація – це взаємодія між фотонами і атомами або молекулами в зразку з утворенням іонних частинок.

Типовий приклад фотодисоціації – фотоліз при фотосинтезі. Вода під дією сонячного світла при реакціях фотосинтезу у фотосинтетичних рослинах розпадається на 2 протони, 2 електрони і молекулу кисню:



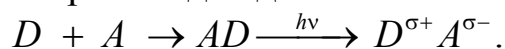
Фотоіонізація – це фізичний процес, при якому іон утворюється в результаті реакції між фотоном і атомом або молекулою:



2. **Фотостеріомерізація** – енергія збудження витрачається на поворот зв'язків в молекулі (див. біофізика зору). У органічних молекул з системою зв'язаних подвійних зв'язків при збудженні *змінюється просторова структура*. Якщо в незбудженому стані обертання двох частин молекули навколо подвійного зв'язку неможливе: зв'язуючі π -орбіталі мають найменшу енергію. Збуджені π^* -орбіталі є такими, що розпушують: π -зв'язок розривається і дві частини молекули повертаються навколо σ -зв'язку на 90° . При переході в зворотному напрямі молекула може повернутися як в початковий стан, так і обернутися навколо подвійного зв'язку.
3. **Фототаутомерізація** – енергія збудження витрачається на внутрішньо-молекулярне переміщення водню (див. Біолюмінісценція).
4. **Фотоприсднання і перенос електрона від молекули** – фотовідновлення і фотоокислення, відповідно. У збудженій молекулі вивільняється електронна вакансія на верхній заповненій орбіталі, в результаті молекула стає акцептором електрона, здатним вступати в реакції фотовідновлення з відповідними донорами. Разом з цим в збудженій молекулі з'являється електрон на порівняно високо розташованій нижній вільній орбіталі. Тому молекула може стати донором електрона і легко вступає в реакції фотоокислення.

Перенос електрона може мати місце між двома молекулами в триплетному стані, що супроводжуються утворення первинно відновленої і первинно окисленої молекул. Первинно відновлена молекула приєднує водень, в результаті утворюючи знебарвлену лейкоформу фотоактивної молекули AN_2 .

Надмолекулярні сполуки, які утворюються при переносі електрона від молекули, що є донором (D) електронів, до молекули-акцептора (A) електронів, називають комплексами з переносом заряду. Ці молекули утримуються за рахунок електростатичних або ван-дер-ваальсових взаємодій, водневих зв'язків. Перенос заряду в незбудженому стані комплексу незначний. При поглинанні фотонів відбувається електронний перехід з S_0 стану донора в S_1 стан акцептора, що відповідає частковому або повному переносу електрона від D до A :



Електронному переходу з переносом заряду належить нова широка смуга поглинання, яка відсутня у окремих компонентах.

5. **Фотоокисдування** – приєднання молекулярного кисню до фотозбудженої молекули. Наприклад, комплекс з переносом заряду утворюється між киснем і різними полімерами, ароматичними сполуками. З певною вірогідністю електронний перехід з перенесенням заряду закінчується окисненням органічних молекул.
6. **Фотогідроліз** – взаємодія фотозбуджених молекул з водою.
7. **Фотодимеризація** – приєднання до збудженої молекули іншої незбудженої молекули з утворенням димера або ексимера.

Розділ 5. ДІЯ УЛЬТРАФІОЛЕТОВОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ НА БІОЛОГІЧНІ МОЛЕКУЛИ

Залежно від дії на біологічні молекули, ультрафіолетове випромінювання ділять на три області:

- 1) УФ-А ($\lambda = 315 \div 400$ нм) – **антирахітна**, викликає синтез вітаміну D;
- 2) УФ-В ($\lambda = 280 \div 315$ нм) – **еритемна**, викликає утворення еритеми і сприяє синтезу пігменту меланіну;
- 3) УФ-С ($\lambda = 200 \div 280$ нм) – **бактерицидна**, викликає мутації, канцерогенез.

Ультрафіолетове випромінювання з $\lambda < 200$ нм при проходженні через атмосферу дуже сильно поглинається, особливо озоновим шаром. З підвищенням положення на рівнем моря інтенсивність ультрафіолетового випромінювання зростає. В повітрі найсильніше поглинаються УФ-С, тому біля поверхні землі реєструється тільки «екологічний ультрафіолет»: УФ-А і більш довгохвильова частина УФ-В.

Значення коефіцієнтів поглинання більшої частини прозорих для видимого світла речовин і живих клітин достатньо великі для ультрафіолетових променів, що забезпечує його сильне поглинання в зовнішніх тканинах тварин і людини (не проникає на глибину більш ніж 1 мм).

Організми, що живуть в товщі води, повністю екранізовані від УФ випромінювання. Бактерії ж в аерозольній частині повітря піддаються сильній дії УФ.

Ефект опромінювання УФ залежить тільки від дози (**правило Бунзена-Роско**) і тому може досягатися при різних потужностях опромінювання. Це так зване правило взаємозамінюваності потужності і часу дії.

Біологічна ефективність УФ променів зростає зі зменшенням довжини хвилі, що видно по спектрах дії різних форм пошкодження біоло-

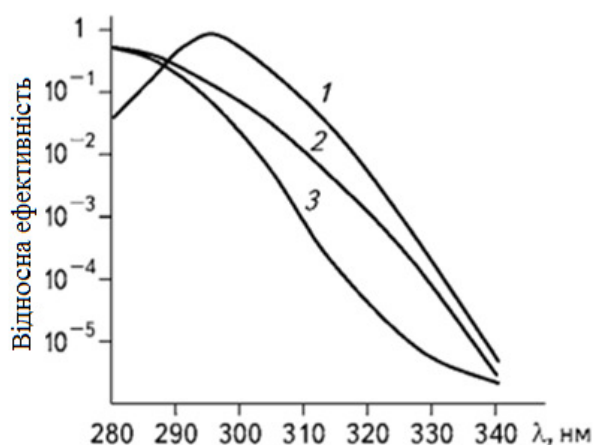


Рис. 5.1. Спектри дії УФ випромінювання: 1 – розвиток еритеми шкіри у людини, 2 – пошкодження рослинної клітини, 3 – інактивація ДНК

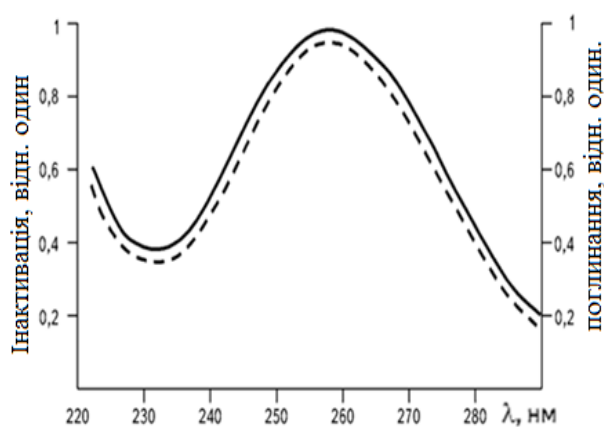


Рис. 5.2. Інактивація вірусу тютюнової мозаїки: суцільна – спектр дії УФ випромінювання, пунктир – спектр поглинання РНК вірусу

гічних систем дією УФ випромінювання. Максимальні значення ефективності випромінювання характерні для УФ-В.

Спектр дії за своєю формою співпадає зі спектром поглинання тих молекул, які відповідають за дану хімічну або фізіологічну відповідь (рис. 5.1). Так спектр інактивації вірусу тютюнової мозаїки повністю співпадає із спектром поглинання інформаційної РНК (рис. 5.2). Це говорить про інактивующем дію УФ на цей вірус за рахунок пошкодження нуклеїнових кислот.

5.1. Синтез вітаміну D

Дія УФ випромінювання, що індукує почервоніння шкіри в мінімальній еритемній дозі протягом 15-20 хв здатне, в залежності від типу шкіри, індукувати вироблення 250 мкг вітаміну D. Проте перетворення провітаміну D₃ на неактивних метаболіти люмистерол і тахистерол врівноважує шкірний біосинтез вітаміну D₃ по механізму зворотного зв'язку. Цей механізм ефективно запобігає “передозуванню” вітаміну D₃ при УФ випромінюванні.

Вітамін D₂, що виробляється рослинами і грибами, а також поступає із зерновими і молочними продуктами, набагато менш ефективний в порівнянні з вітаміном D₃.

Вітамін представлений двома формами – ергокальциферол і холекальциферол. Хімічно ергокальциферол відрізняється від холекальциферолу наявністю в молекулі подвійного зв'язку між C₂₂ і C₂₃ і метильною групою при C₂₄.

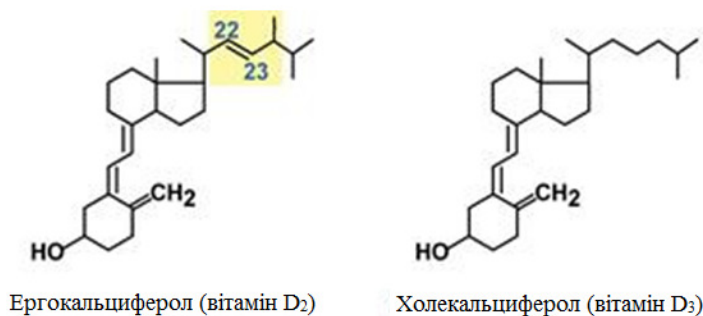


Рис. 5.3. Будова двох форм вітаміну D ергокальциферолу та холекальциферолу

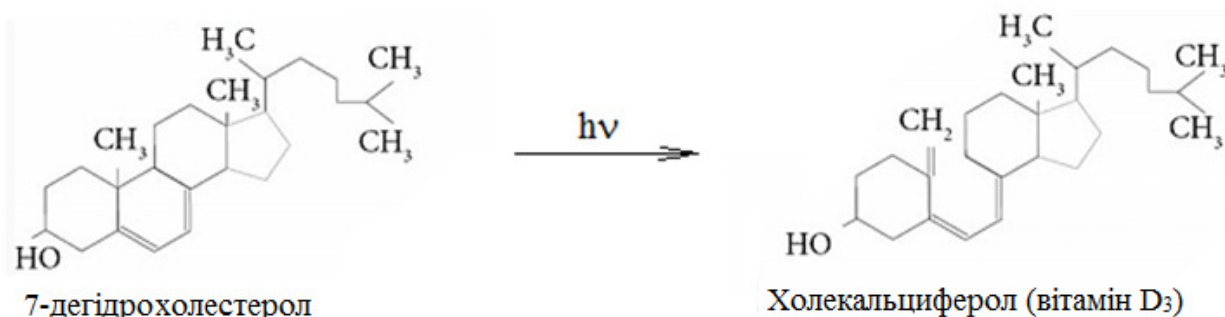


Рис. 5.4. Фотоутворення вітаміну D₃

Вітамін D₃ утворюється в епідермісі шкіри під впливом ультрафіолетових променів сонячного світла з провітаміну D₃ (7-дегідрохолестерина). Провітамін D₃ перетворюється на холекальциферол шляхом теплової ізомеризації (при температурі тіла).

При дії світла в процесі фотохімічної реакції відбувається розщеплювання π -зв'язку в кільці і внутрішньомолекулярне перенесення атома водню.

У епідермісі холекальциферол зв'язується з вітамін-D-зв'язуючим білком і у такому вигляді поступає в кров і переноситься в печінку. Знаходження в тіні і хмарна погода можуть зменшити вироблення вітаміну на 60 %. Через скло, одяг і крем від засмаги ультрафіолет, необхідний для синтезу вітаміну, не проникає. Достатня кількість вітаміну виробляється шкірою при регулярному опромінюванні в солярії, проте це може привести до онкологічних захворювань шкіри.

При УФ опромінюванні харчових продуктів з ергостерину утворюється вітамін D₂, що використовується в лікувальних цілях.

5.2. Фотобіологічні процеси в шкірі

Всі фотобіологічні процеси у фотомедицині прийнято ділити на фототоксичні і фотоалергічні. **Фототоксичні** ефекти виникають під дією оптичного випромінювання. Такі ефекти характеризуються наявністю порогової дози, ефект посилюється зі збільшенням дози або концентрації речовини. До фототоксичних сполук відносяться псоралени, порфірини, тетрациклін, фетотіазіни та ін. Клінічно фототоксичні ефекти виявляються у формі еритеми, едеми, пігментації і т. д. Багато фототоксичних сполук (псоралени і порфірини) у поєднанні зі світловим опромінюванням володіють терапевтичною дією при псоріазі і інших захворюваннях шкіри.

Для прояву **фотоалергічних** ефектів, які також виникають після поглинання світла хімічною сполукою в шкірі, необхідна первинна імунологічна сенсibiliзація. Фотоалергічні процеси відрізняються від фототоксичних двома критеріями:

- 1) Фотоалергія перед проявом ефекту вимагає декількох сенсibiliзуючих дій; для індукції фототоксичного ефекту достатньо одного опромінювання.
- 2) Чутливість у фотоалергену виявляється не у всіх пацієнтів, фототоксичний ефект виявляється у всіх. Фотоалергію може викликати декілька малих доз.

Шкіра людини складається з епідермісу (0.07-0.12 мкм) і дерми (1-2 мм). У епідермісі (рис. 5.5-5.6) поглинається велика частина ультрафіолету. Епідерміс – багатошаровий епітелій (рис. 5.7), що складається переважно з епідермальних кліток, – кератиноцитів. Також є клітки

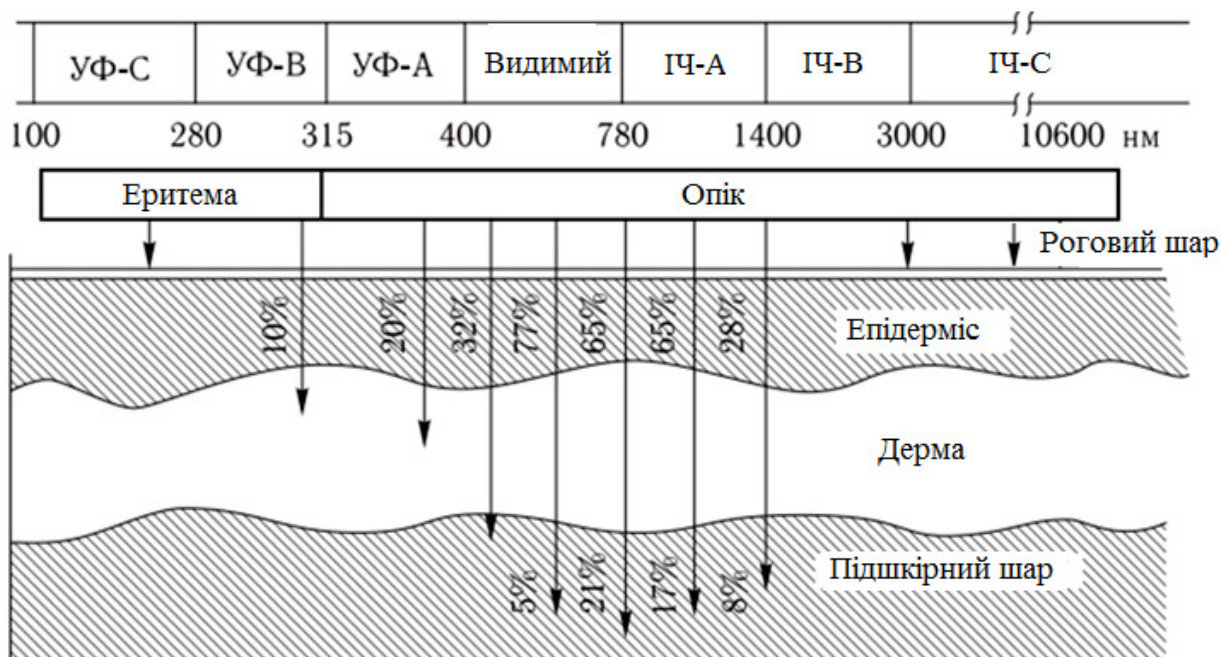


Рис. 5.5. Пропускання світла різних довжин хвиль шкірою

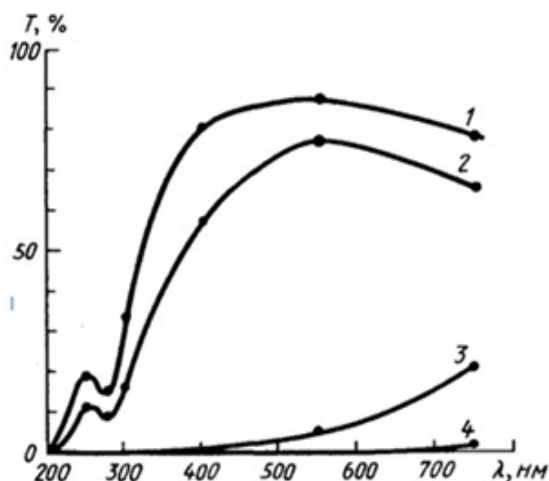


Рис. 5.6. Спектри пропускання поверхневих тканин білої людини: 1 – роговий шар епідермісу товщиною 30 мкм, 2 – шар епідермісу товщиною 50 мкм, 3 – шкіра (2мм), 4 – шкіра і поверхнева тканина (25 мм).

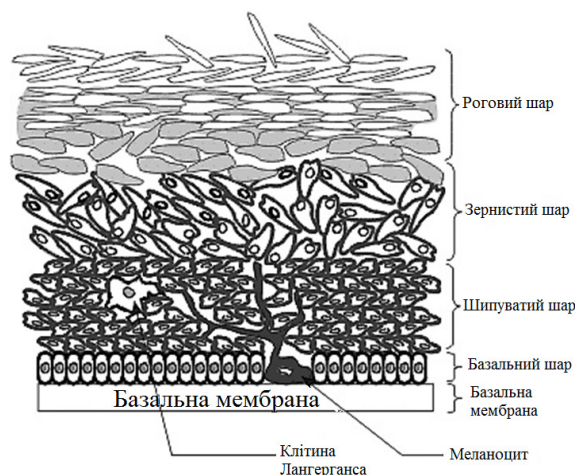


Рис. 5.7. Будова епідермісу

нейроектодермального походження – меланоцити. Кератиноцити утворюють п'ять паралельних поверхневих шарів, кожен з яких відповідає певній стадії диференціації кератиноцитів. До дерми примикає базальний шар, потім йдуть шипуватий, зернистий, блискучий і роговий шари. Базальні клітки мають стовпчасту форму, здатні ділитися і відповідають за зростання епідермісу. Зернисті клітки ущільнені. Роговий шар складається з омертвілих плоских кератиноцитів.

У базальному шарі знаходяться меланоцити – пігментні клітини, що мають меланосоми – гранули з меланіном. Ці клітини містять тирозиназу, що бере участь в перетворенні тирозину на меланін і під дією світла можуть різко змінювати свою форму, утворюючи псевдоподії.

Під епідермісом лежить дерма, що має два шари – сосочковий і ретикулярний. Сосочковий шар сформований рихлою сполучною тканиною, пронизаною колагеновими, еластиновими, м'язовими і нервовими волокнами, а також кровоносними судинами (капілярами, венули, артеріоли).

Завдяки високому вмісту речовин (білки, нуклеїнові кислоти, пігменти), що поглинають світло, а також неоднорідності шкіра за рахунок поглинання, віддзеркалення і розсіювання добре ослабляє оптичне випромінювання (рис. 5.5). УФ випромінювання з $\lambda < 315$ нм поглинається майже повністю вже в епідермісі.

Ультрафіолетові промені, що проникають в шкіру, майже повністю поглинаються в ній на глибині до 0.5 мм. Промені коротше 219 нм поглинаються в роговому шарі. Прозорість різних ділянок шкіри варіюється в залежності від товщини зовнішнього рогового шару. Промені з 200-250 нм проникають в роговий шар і викликають еритему. Промені з 250-270 нм проходять через зернистий шар, викликаючи пігментацію і еритему. Промені, з довжиною хвилі 270-320 нм, проникають до судинного шару, викликаючи рясну пігментацію і еритему, стимулюють роботу жирових залоз і нервових закінчень шкіри. Промені з 320-390 нм проходять через дерму викликають пігментацію, частіше без попередньої еритеми. Довші промені доходять до підшкірної клітковини, викликаючи почервоніння шкіри внаслідок теплового ефекту.

Еритема – почервоніння шкіри, що виникає внаслідок розширення кровоносних судин шкіри – гіперемії.

Зазвичай при застосуванні інфрачервоних променів виражених змін з боку шкіри не спостерігається, оскільки виникаюче відчуття опіку і біль перешкоджають тривалій дії цих променів. **Еритема (калориметрична або теплова еритема)**, що розвивається в результаті дії інфрачервоних променів, виникає безпосередньо після опромінювання, є нестійкою, тримається недовго (30-60 хвилин) і носить головним чином гніздовий характер. Після тривалої дії інфрачервоних променів з'являється бура пігментація плямистого вигляду.

Дія ультрафіолетових променів на шкіру викликає характерну реакцію з боку судин шкіри – **ультрафіолетову еритему**. Ультрафіолетова еритема істотно відрізняється від теплової еритеми, викликаній інфрачервоним опромінюванням. Після припинення дії УФ опромінювання, через 2–8 годин з'являється почервоніння шкіри (ультрафіолетова еритема) одночасно з відчуттям печіння. Еритема з'являється після прихо-

ваного періоду, в межах опроміненої ділянки шкіри (має різко обкреслені межі і розвивається тільки там, де подіяла безпосередньо радіація), і змінюється засмагою і лущенням. Тривалість еритеми має тривалість від 10-12 годин до 3-4 днів. Почервоніла шкіра гаряча на дотик, трохи хвороблива і здається набряклою.

По суті еритема є запальною реакцією, опіком шкіри. Це особливе, асептичне запалення.

Спектри дії УФ еритеми отримували наступними способами:

1. Серію ділянок шкіри опромінювали однаковими дозами монохроматичного УФ випромінювання. Через певний час (8 год., 24 год., 10 днів) оцінювали ступінь почервоніння опромінених ділянок. Будува-лися графіки залежності ступеня почервоніння як функцію довжини хвилі.
2. Для кожної довжини хвилі визначали величину мінімальної еритемної дози (МЕД – доза, що викликала мінімальне виявлене оком поче-рвоніння через певний час після опромінювання: 8 год., 24 год. або 10 днів). Усереднений за даними багатьох авторів спектр дії пред-ставлений на рис. 5.8, який довгий час вважався стандартним спек-тром дії. Він (при аналізі через 24 ч) має максимум при 297 нм, про-вал при 280 нм і короткохвильовому максимумі при 245–248 нм.

УФА-еритема. Ультрафіолетове випромінювання різного діапазо-ну надає різну дія. УФ-А випромі-нювання найменш ефективне. Ери-темна ефективність ($1/\text{МЕД}$) при 365 нм в $\sim 100\text{-}1000$ разів нижче, ніж при 297 нм. УФА-еритема ви-являється відразу після опроміню-вання. При пороговій дозі (~ 130 кДж/м²) негайно виникаюче почер-воніння проходило за декілька хви-лин. При дозі УФА 500 кДж/м² по-червоніння зберігалось до 24 год. УФА-еритема має фіолетовий від-тінок, що вказує на розширення глибоко розташованих судин дер-ми. УФА-випромінювання викли-кає запальну реакцію, що гістологи-чно виявляється, в дермі, але не в епідермісі.

УФВ-еритема. Їй завжди передує латентний період, тривалість якого назад пропорційна дозі опромінювання, але ніколи не перевищує 8-10 год. Тривалість еритеми пропорційна дозі, а ступінь почервоніння – логарифму дози. Найбільш яскраве почервоніння після опромінюван-

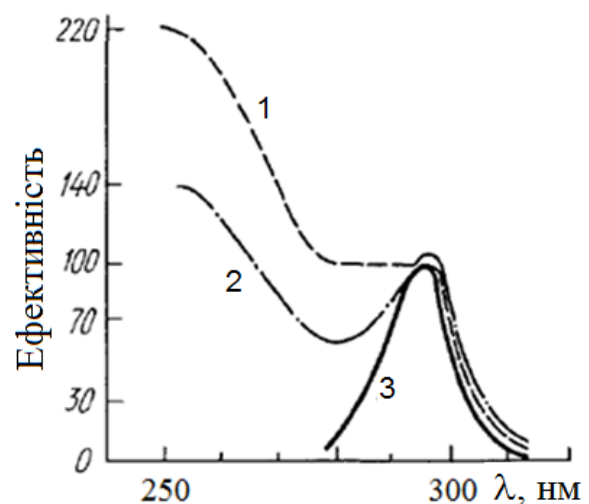


Рис. 5.8. Спектри дії еритеми (МЕД по ступені почервоніння) через 1) 8 год., 2) 24 год., 3) 10 днів після УФ опромі-нення

ня доводиться на 8-10 год. МЕД для різних ділянок шкіри на різних ділянках тіла. Після УФВ-опромінення гістологічно виявляється запальна реакція як в дермі, так і в епідермісі.

УФС-еритема. Також має латентний період, що не перевищує 8-10 год. Тривалість латентного періоду УФС-еритеми більша, ніж УФВ-еритеми за умови опромінювання рівними дозами. УФС-еритема проходить раніше УФВ-еритеми і ніколи не буває яскраво-червоної. Якщо УФВ-випромінювання в дозі 10 МЕД викликає сильний опік шкіри (едему) з утворенням на шкірі міхурів, то УФС-випромінювання викликає тільки рожеву еритему, не перехідну в едему.

Форма дії УФ еритеми залежить від часу, що пройшов між опромінюванням і реєстрацією почервоніння шкіри. Так, якщо почервоніння реєструвати через 10 діб після опромінювання, то в спектрі дії залишається тільки один максимум (рис. 5.8.).

Вважається, що еритема в результаті дії коротких довжин хвиль (254 нм) утворюється через 2–3 години, досягає максимуму через 12–24 години і затухає через 72 години. Еритема ж, що утворюється під впливом довгохвильових променів (313–302 нм), починається через 5–6 годин, через 24–28 годин досягає максимуму і проходить на 4–5 день.

Основна кількість ультрафіолетових променів поглинається в основному шарі епідермісу. Процеси фотолізу і денатурації приводять до загибелі шилоподібних кліток зародкового шару. Активні продукти фотолізу білків викликають **розширення судин**, набряк шкіри, вихід лейкоцитів і інші типові ознаки еритеми.

Продукти фотолізу, розповсюджуючись по кровоносному руслу, дратують також нервові закінчення шкіри і через центральну нервову систему рефлекторно впливають на всі органи. Еритема розглядається як складний рефлекс, у виникненні якого беруть участь активні продукти фотолізу. Ступінь вираженості еритеми і можливість її утворення залежить від стану нервової системи. На уражених ділянках шкіри, при обмороженні, запаленні нервів еритема або зовсім не з'являється, або виражена дуже слабо, не дивлячись на дію ультрафіолетових променів.

Максимум в спектрі дії при 292-294 нм належить антиоксиданту α -токоферолу (максимум поглинання при 292 нм). Для виникнення УФВ-еритеми необхідно зруйнувати антиоксиданти в шкірі.

Слідом за фотохімічними реакціями в шкірі розвиваються темнові біологічні реакції, що приводять до розширення судин дерми (**вазодилатації**) – еритеми. УФВ-еритема ослабляється або зовсім не розвивається, якщо на шкіру наносилися інгібітори ланцюгового окислення ліпідів (антиоксиданти) α -токоферол або інол. Інгібуючий ефект антиоксидантів не залежить від того, чи були присутні вони на шкірі до опромінювання або нанесені безпосередньо після цього. Отже, антиоксидан-

ти інгібують не фотохімічну стадію еритеми, а темнові реакції, серед яких є і реакції пероксидного ланцюгового окислення ліпідів шкіри. Таким чином, максимум спектру дії УФВ-еритеми (292-294 нм) відображає поглинання фотонів α -токоферолом і його фотолізу як умову розвитку пероксидного окислення ліпідів. Нанесення на шкіру антиоксидантів через 5 годин після УФВ-опромінення не приводить до інгібування еритеми.

У шкірі є система ферментів для утворення з поліненасичених жирних кислот простагландинів, які утворюються в епідермісі незабаром після УФВ-опромінення в підвищених кількостях і володіють прямою судинорозширювальною дією на судини дерми. Інгібіторами синтезу простагландинів можуть бути індометацин і аспірин, якщо їх вводити не пізніше 24-28 год. після УФВ-опромінення.

У перші години найважливішу роль грають процеси пероксидації ліпідів, потім продукти окислення ліпідів активізують синтез простагландинів. Пізні стадії (після 24 год) протікають без участі простагландинів.

Темнові стадії УФС і УФА-еритеми інші, чим для УФВ-еритеми: УФС-еритема абсолютно не інгібується антиоксидантами, а УФА-еритема не інгібується антипростагландиновими агентами.

Для УФВ і УФС характерний прояв **фотореактивації**. Якщо після опромінювання шкіру освітити видимим світлом, то еритемний ефект зменшується. Це пов'язано з активацією видимим світлом ферменту, що фотореактивує тимінові димери ДНК.

5.3. Пігментація шкіри (засмага)

Тільки дуже слабка еритема може пройти без подальшої засмаги.

Пігментація шкіри – захисний фотобіологічний процес, що приводить до утворення пігменту **меланіну**, який захищає шкіру від фотопошкодження декількома способами:

- 1) поглинає фотони і ослаблює інтенсивність діючого випромінювання;
- 2) перехоплює вільні радикали, які утворюються при опромінюванні шкіри.
- 3) зв'язує іони заліза, які каталізують процес пероксидного окислення ліпідів, тобто меланіни є інгібіторами.

Будова меланіну складна, якщо навести його усереднену бруттоформулу, то склад вийде таким: $C_{77}H_{98}O_{33}N_{14}S$. Незвичайним виявилось наявність в меланіні неспарених електронів, що додає цій речовині властивості стабільних вільних радикалів. Неспарені електрони сприяють ефективнішому поглинанню сонячної радіації. Крім того, вони легко за-

хоплюють і знешкоджують небезпечні для клітин високоактивні вільні радикали.

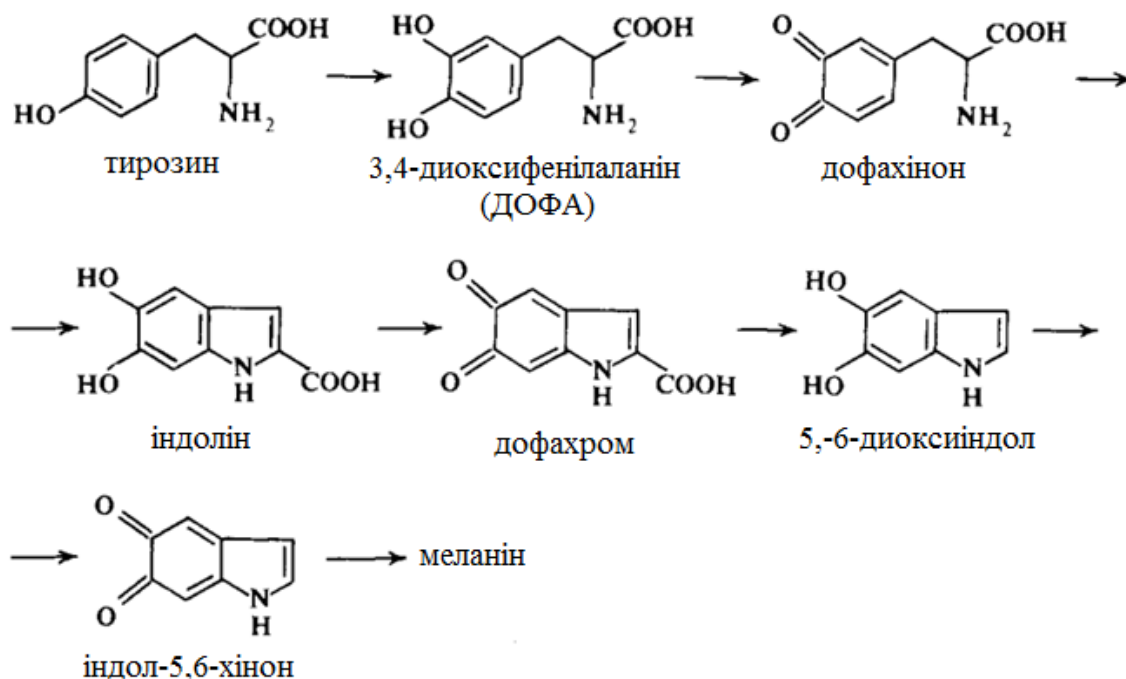
Меланін діє як нейтральний фільтр інтенсивності і зменшує кількість радіації, яка може досягти нижнього шару шкіри, що містить життєздатні кератиноцити, або проникнути в дерму та вразити кровоносні судини.

Зі збільшенням природної або придбаної пігментації збільшується і доза, необхідна для розвитку еритеми. Великі дози УФС-випромінювання (254 нм) здатні пошкодити механізм меланогенеза, що приводить до блокування пігментоутворення.

Непряма (сповільнена) пігментація. Починається слідом за еритемою через 2-3 сут. після опромінювання, досягає максимуму на 13-21-й день і потім згасає за декілька місяців.

Уф-випромінювання запускає складний ланцюг темнових реакцій біосинтезу меланіну. Непряма пігментація активується випромінюванням з $\lambda < 320$ нм. Спектр дії нагадує спектр дії еритеми. Може з'явитися і після дії УФС, УФА і короткохвильового видимого світла. Для утворення засмаги від довгохвильових променів (380 нм) необхідно в 500 разів більше енергії, чим від променів з довжиною хвилі 296.7 нм. Загалом вважається, що для виникнення засмаги, обумовленої променями 313 – 410 нм, необхідно в 100 разів більше енергії, чим для утворення еритеми.

Під дією УФВ-випромінювання в шкірі в ході темнових біохімічних реакцій активізується фермент тирозиназа, що бере участь в перетворенні тирозину на меланін:



Дві перші стадії утворення меланіну проходять за участю фермен-

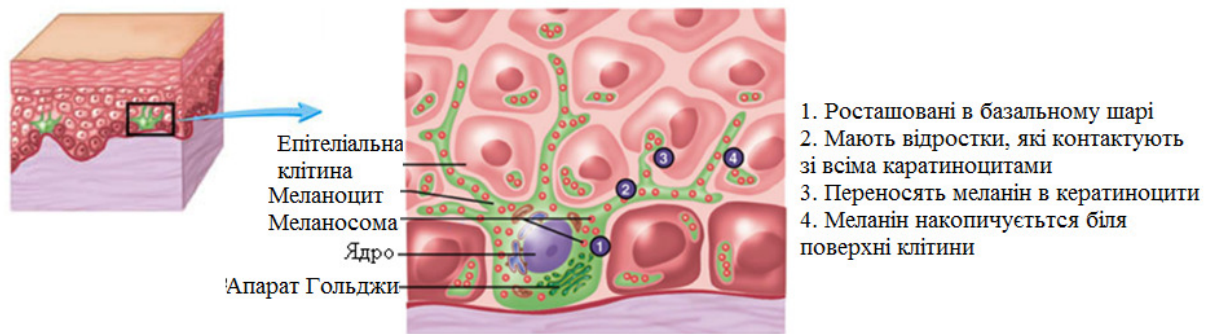


Рис. 5.9. Розподіл меланіну в шкірі

тів. Подальші реакції легко здійснюються спонтанно за участю супероксиданіона та інших вільних радикалів.

Синтез меланіну здійснюється в спеціальній органелі меланоцитів – меланосомах (рис.5.9). Роль пускового механізму в процесі утворення меланіну (меланогенезі) належить ультрафіолетовим променям, що викликають роздратування периферичних рецепторів. Нервові імпульси поступають в певні центри головного мозку, що стимулює секрецію і викид в кров меланінстимулюючих гормонів, які активують вироблення пігментів.

При цьому Уф-випромінювання викликає наступні процеси:

- 1) Активація проліферація меланоцитів (процес розростання тканин через ділення і зростання кліток);
- 2) Меланоцити гіпертрофуються і випускають розгалужену цитоплазму вирости псевдоподії (тимчасові вирости в цитоплазмі).
- 3) Збільшення числа меланосом;
- 4) Зростає швидкість утворення меланіну в меланосомах;
- 5) Посилення переносу меланосом в кератиноцити, що співпадає зі збільшенням швидкості ділення і зміни кератиноцитів;
- 6) Зростання розміру меланосом;
- 7) Пошкодження в епідермісі сульфгідрильних сполук, які інгібують тирозиназу. Активність тирозинази зростає.

У чорній шкірі меланін розподілений рівномірно по всьому епідермісу від базального шару до рогового, у тому числі і в міжклітинному просторі, та всередині кожного кератиноциту. У шкірі європеоїдів меланосоми в основному зосереджені в базальному шарі та руйнуються всередині кератиноцитів задовго до того, як досягають рогового шару.

Пряма (негайна) пігментація. Виникає прямо під променями, досягає максимуму за 1-2 ч і зменшується через 3-24 ч після опромінювання. За цю дію відповідають в основному довгохвильові ультрафіолетові промені (340 нм) і видиме світло (максимум 400-480 нм). Ніколи не приводить до сильного потемніння шкіри.

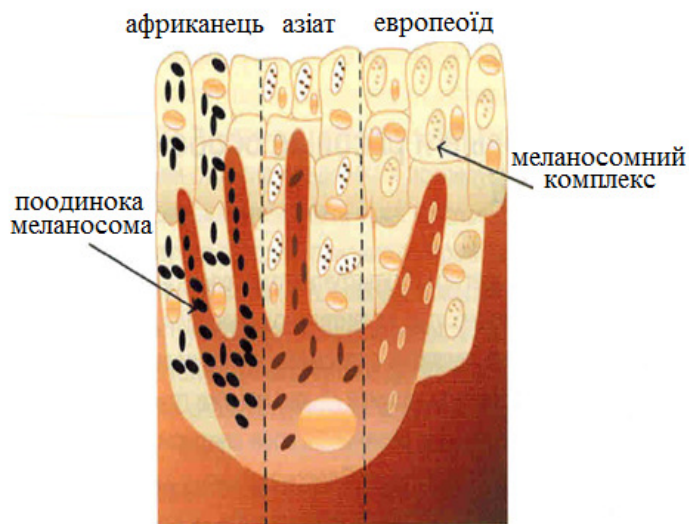


Рис. 5.10 Розподіл меланінових гранул і комплексів в шкірі людей різних рас

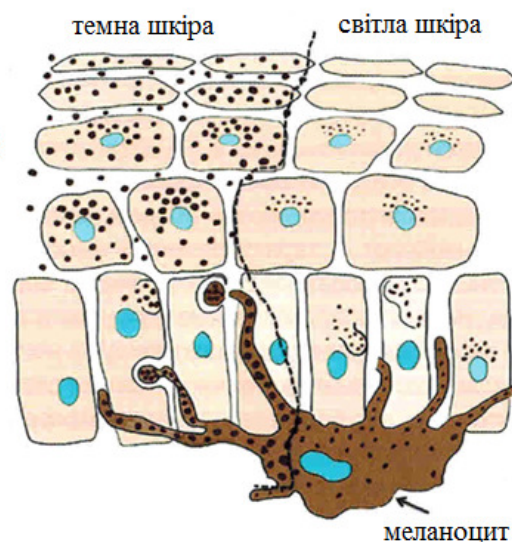


Рис. 5.11. Розподіл меланіну в шкірі людей з темнопігментаційною та світлою шкірою

Полягає в прямому фотохімічному окисненні відновленого попередника меланіну в меланін. Часткове потемніння шкіри в ході прямої пігментації відбувається в результаті активного пересування меланосом в псевдоподії меланоцитів. Нові меланосоми при цьому не утворюються. Пряма пігментація не дуже інтенсивна, але вона здійснює частковий захист безпосередньо від падаючого випромінювання.

Меланін в шкірі – прекрасний фільтр; він затримує більше 90% ультрафіолетового випромінювання. Проте утворення меланіну – не єдиний природний механізм захисту шкіри. При сильному сонячному опромінюванні і просто засмагла людина (рис. 5.10, 5.11), і навіть африканець, що потрапили на жарке сонце після довгої перерви, не застраховані від сонячного опіку. Разом з тим альбіноси, що зовсім не мають меланіну, виробляють деяку стійкість до ультрафіолету. Серед додаткових механізмів захисту найдієвіший – утворення на поверхні шкіри товстого рогового шару з мертвих кліток. Коли опромінювання повторюється, роговий шар стає ще товщим. Тому засмагла шкіра грубіша і шорсткіша, чим була до засмаги.

Інший захисний агент – **уроканова кислота**, присутня в зовнішніх шарах шкіри. У її молекулі є система зв'язаних зв'язків $C=N-C=C-C=C$, що ефективно поглинає світло, при цьому змінюється форма молекули: транс-форма переходить в цис-форму, а в темноті йде зворотна реакція. Таким чином уроканова кислота перетворює ультрафіолетову радіацію просто в теплоту, яка розсіюється в навколишнє середовище.

5.4. Абіогенний вплив ультрафіолету

До абіогенних або несприятливих для людини ефектів УФ випромінювання, слід відносити:

1. бактерицидна дія (280–210 нм); УФ 253–267 нм найефективніше знищує мікроорганізми.

2. канцерогенна дія (опіки, дерматит, деградація колагену, розвиток ерозій, виразок, доброякісних і злоякісних пухлин);

3. фототоксикоз (пошкодження шкіри видимим випромінюванням (320-400 нм), в присутності фотосенсибілізаторів, не обумовлене алергічною реакцією);

4. фотоалергія (придбана здатність шкіри давати реакцію на ультрафіолетове випромінювання).

Бактерицидна дія ультрафіолетових променів. Летальна дія ультрафіолетових променів на клітини мікроорганізмів використовується для обеззаражування приміщень, хірургічних інструментів, посуду, повітря і т.д. Для цієї мети пристосовують штучні джерела ультрафіолетових променів великої потужності – бактерицидні лампи. Дози бактерицидної дії УФ променів повинні бути настільки значними, щоб виключалася можливість виживання навіть одиничних кліток.

Фотоканцерогенез – виникнення рака шкіри, викликане дією фототоксичних речовин при опромінюванні ультрафіолетовим світлом протягом певного часу. Це основний чинник виникнення багатьох пухлин шкіри і доброякісних, і злоякісних. Причому це може бути і природний ультрафіолет (сонячне випромінювання), і ультрафіолет штучний. Цей процес зазвичай кумулятивний, виникає при хронічному опромінюванні. Тому чим старша людина, тим вище шанс виявити у нього якусь пухлину шкіри, як доброякісну, так і злоякісну. При тривалому перериванні УФ опромінення ефект від попереднього використання знімається.

Фотоалергія. Реакції гіперчутливості сповільненого типу, що виникають після опромінювання ультрафіолетом, називаються фотоалергічними. Щоб така реакція розвинулася, людина вже повинна мати чутливість до лікарського препарату або хімічної речовини з фотосенсибілізуючими властивостями.

Феномен фотосенсибілізації є підвищена чутливість організму (зазвичай шкіри і слизових оболонок) до дії ультрафіолетового (діапазон 320-400 нм) або видимого (діапазон 400-800 нм) випромінювання. Реакції фотосенсибілізації можуть виникати в будь-якому віці у представників всіх рас і протікають як за негайним, так і по сповільненим типом. Відомий цілий ряд хімічних речовин, які, накопичуючись в шкірі, стають причиною фотоалергічних, фототоксичних реакцій, а також інших фотодерматозів на ділянках шкіри, що піддалися світловому опромінюванню.

При фотоалергічній реакції хімічна речовина (лікарський засіб), яка

міститься в шкірі, поглинає фотони і утворює нову сполуку, своєрідний «фотопродукт». Це модифікована сполука зв'язується з білками цитоплазми або мембранних, утворюючи антиген. Фотохімічно утворений антиген взаємодіє з макрофагами і Т-лімфоцитами.

Перше застосування лікарського засобу приводить до сенсibilізації Т-лімфоцитів. Шкірні висипання з'являються тільки при повторному його використанні (алергічна реакція сповільненого типу). Навіть при дуже слабких повторних діях Т-лімфоцити впізнають алерген і виникає у відповідь реакція шкіри. Схему алергічної реакції можна представити у вигляді:



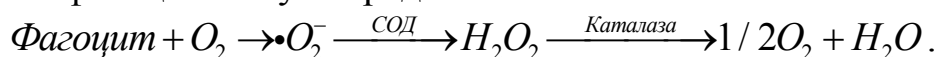
Найчастіше причиною фотоалергічних реакцій є саліциланіліди, що галогенізуються, для зовнішнього застосування, бензокаїн (входить до складу мила та інших миючих засобів), амбровий мускус (міститься в лосьйонах після гоління).

Фотохіміотерапія. Давно відома позитивна дія світла на живі об'єкти, від простих до вищих. Наприклад, УФ опромінення в еритемних і суб'еритемних дозах володіє профілактичною і лікувальною дією при ряді захворювань людини, викликає позитивні зрушення у функціях серцево-судинної, ендокринної, нейрогуморальної, дихальної систем. Механізм фотохімічних реакцій, що лежать в основі цих позитивних ефектів, на жаль, майже завжди не відомий.

У деяких клітках присутні спеціалізовані фоторецептори для цілеспрямованого позитивного використання енергії фотонів. Такими рецепторами можуть бути фотореактивуючі ферменти, виявлені в даний час не тільки у одноклітинних організмів, але і в клітках людини. Ці ферменти не володіють власним поглинанням в області $\lambda > 300\text{нм}$. Хромофорна група утворюється при формуванні комплексів ферменту з піримідиновими димерами ДНК. Під дією світла 300–500 нм за участю цих ферментів відбувається фотомономеризація піримідинових димерів.

Відомий приклад використання лазерів в цілях терапії – це прискорення загоєння ран при опромінюванні раневої поверхні. Механізм такої дії випромінювання заснований на реактивуючій дії світла лазера ($\lambda = 632\text{ нм}$) на захисні ферменти каталазу і супероксиддисмутази (СОД), простетичні групи цих ферментів мають смуги поглинання в червоній області спектру. Фермент супероксиддисмутаза (СОД) каталізує реакцію утворення пероксиду водню з супероксидних радикалів ($\cdot\text{O}_2^-$), які

продукуються фагоцитами у осередках запалення:

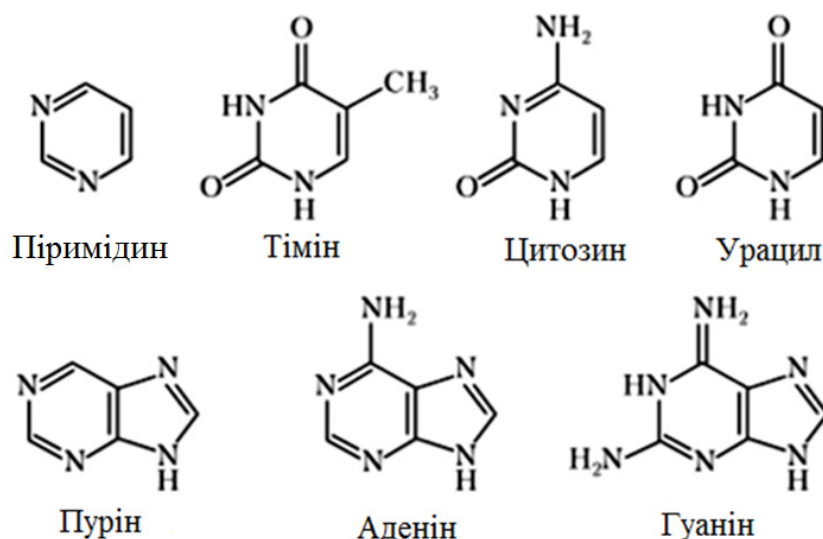


При недостатній активності СОД і каталази в реакцію з супероксидним радикалом вступають іони заліза з утворенням високотоксичних гідроксильних радикалів $\text{OH}\bullet$ і OH^- . У осередку запалення має місце ін-активація СОД пероксидом водню. Освітлення світлом лазера приводить до відновлення структури простетичної групи СОД і каталази, і відбувається їх реактивація.

5.5. Фотохімічне пошкодження ультрафіолетового випромінювання

Біологічний ефект УФ перш за все визначається змінами, який він викликає в структурі білків, нуклеїнових кислот, а також біологічних мембран. Тому часто виявляється прямий зв'язок між спектром дії пошкодження молекули або біологічної системи зі спектром поглинання тих речовин, пошкодження яких спричиняє за собою спостережувану реакцію на опромінювання. В області довжин хвиль 200-400 нм сильним поглинанням характеризуються сполуки з подвійними зв'язками, з кільце-подібними структурами.

Дія на нуклеїнові кислоти. Поглинання ультрафіолету (з максимумом $\lambda_{\text{max}} = 260$ нм) нуклеїновими кислотами обумовлене наявністю в них пурінових і піримідинових основ. Чутливішими до дії опромінювання є піримідинові основи (цитозин, тимін і урацил), хоча пошкодження можуть виникати і в пурінових основах (аденін, гуанін) і у вуглецевих компонентах.



Основним типом фотохімічної реакції нуклеїнових кислот є утворення піримідинових димерів циклобутанової структури, що виникає шляхом зшивання прилеглою один до одного піримідинових основ, наприклад, тимінів, тимінового і цитинового залишків і т.д.

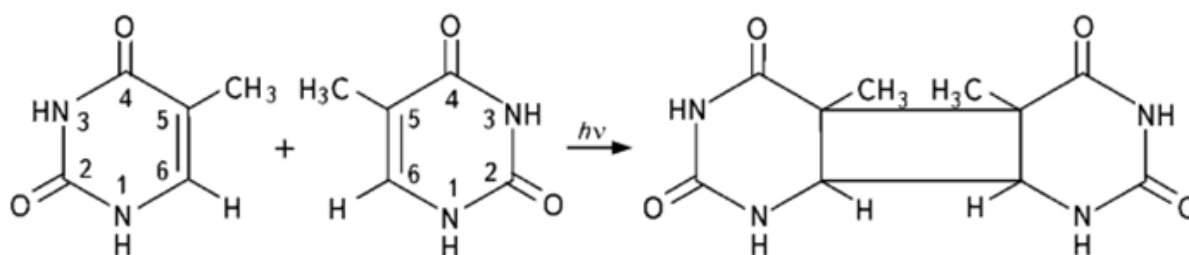
Менші квантові виходи властиві іншим фотохімічним реакціям, ін-

дукованим ультрафіолетовим випромінюванням. Ці пошкодження грають важливу роль при інактивації кліток, мутагенезі і канцерогенезі. Так, в результаті розривів полінуклеотидного ланцюга одонитчаті і рідше двонитчаті розриви ДНК. Утворення розривів приводить до зменшення молекулярної маси ДНК. Квантовий вихід розривів приблизно на три порядки нижчий, ніж для утворення піримідинових димерів.

Ще менші значення квантових виходів характерні для утворення внутрішньо- і міжмолекулярних зшивань в ДНК, а також зшивань ДНК-білки.

Пошкодження ДНК відрізняються від інших тим, що вони супроводжуються порушеннями генетичної коди, ускладнюють здійснення найважливіших для життєдіяльності кліток процесів: реплікацію і транскрипцію. Піримідинові димери відрізняються високою стабільністю, і в клітинах, де вони виникають, ДНК не може піддаватися реплікації.

Найбільш поширеним фотопошкодженням ДНК є утворення димера з двох молекул тиміну розташованих поряд в одному ланцюзі ДНК. Між основами утворюється циклобутанове кільце:



Іноді димери утворюються між молекулами тиміну з двох комплементарних ланцюгів. Відомо, що в нативній ДНК дві молекули тиміну ніколи не можуть бути розташовані напроти один одного, оскільки вони некомплементарні. Проте під дією ультрафіолетового випромінювання можливе локальне розплітання двоспінальної структури і переміщення комплементарних ланцюгів щодо один одного, внаслідок чого молекула

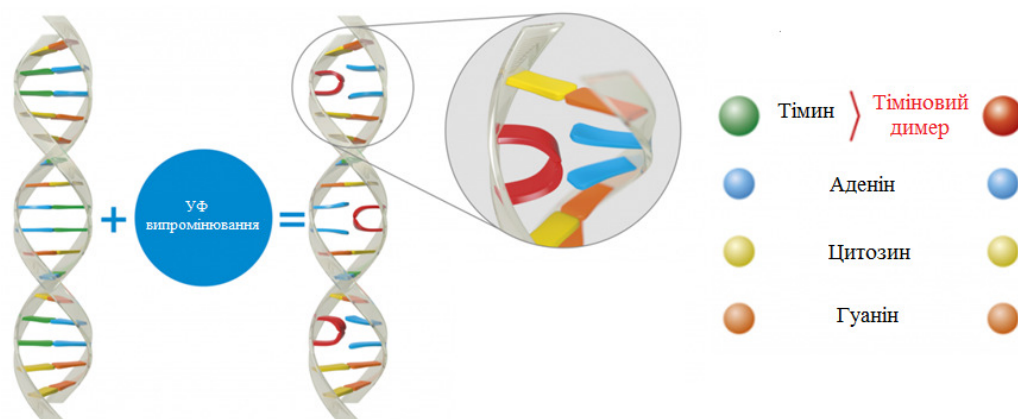


Рис. 5.12. Фоторуйнування ДНК

тиміну може опинитися напроти іншої такої ж молекули (рис. 5.12). Тіміновий димір в цьому випадку стабілізує виникле пошкодження. Утворення тимінових димерів може відбутися при поглинанні кванта світла не тільки самою молекулою тиміну, але і будь-якою іншою азотистою основою, оскільки можливе триплет-триплетний перенос енергії від однієї основи до іншої в наступній послідовності: цитозин, гуанін, аденін, тимін. Саме у цьому напрямі відбувається зменшення енергії триплетних рівнів азотистих основ. З меншою вірогідністю в порівнянні з тиміновими димерами, можуть утворюватися димери цитозин-цитозин (Ц-Ц) і тимін-цитозин (Т-Ц).

Димери тиміну, що утворилися, хімічно дуже стійкі і не руйнуються при підвищенні температури або при дії хімічних речовин. Проте процес мономеризації можна викликати дією ультрафіолетового випромінювання іншого діапазону, причому максимальний вихід мономерів спостерігається при опромінюванні в більш короткохвильовій області в порівнянні з максимальним виходом димерів. Іншими типами фотопошкоджень ДНК є: **фотогідратація** (утворення 6-окси-5-гідроксипохідних), зшивання ДНК-білок (ковалентне приєднання до молекул цитозина або урацила по 5-му або 6-му атомах деяких амінокислот, наприклад, серину, цистину та ін.), зшивання ДНК-ДНК, одно- або двониткові розриви ланцюгів ДНК, але їх квантовий вихід нижче на декілька порядків, в порівнянні з виходом пірімідинових димерів. Фотопошкодження нуклеїнових кислот можуть привести до появи мутацій, канцерогенезу і навіть до загибелі клітки. Часто ці пошкодження перешкоджають нормальному проходженню процесів транскрипції і реплікації нуклеїнових кислот, що унеможливає нормального ділення клітини. Так, при появі в ДНК димерів азотистих основ неможлива реплікація ДНК.

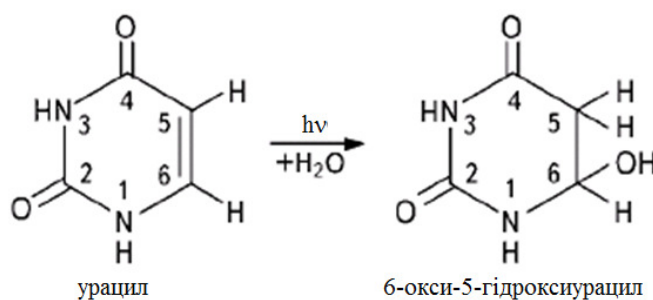
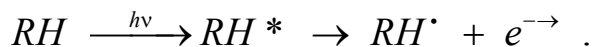


Рис. 5.13. Фотогідратація урацила

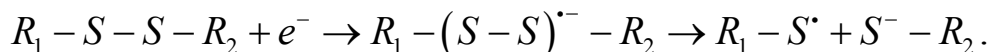
Дія на білки. У білків за поглинання в області 280 нм відповідають ароматичні амінокислоти. Дія УФ на білкові молекули здатна привести до розриву дисульфідних містків між поліпептидними ланцюгами, утворенню вільних радикалів. Якщо пошкоджується активний центр ферменту, то це може викликати його інактивацію.

Пошкодження ультрафіолетовими променями білкових молекул зобов'язане фотохімічним перетворенням перш за все залишку триптофану, а також ароматичним амінокислотам – тирозину і фенілаланіну. В

результаті поглинання фотофізичних процесів, супроводжуваних поглинання квантів вказаними амінокислотами, утворюються вільні катіон-радикали, які, піддаючись дисоціації, перетворюються на нейтральні радикали:



Що виникають при цьому сольватовані електрони відрізняються високою реакційною здатністю і беруть участь у ряді хімічних реакцій, наприклад, за їх участю відбувається розрив дисульфідних зв'язків в білку:



Катіон-радикал триптофану може піддаватися окисленню, що приводить до утворення кинуреніна або інших стабільних продуктів фотолізу цієї амінокислоти.

Квантовий вихід фотоінактивації ферментів, обумовленої фотохімічними перетвореннями триптофану і цистину, мають порівняно невисокі значення близько 10^{-4} . Деякі білки не містять залишків триптофану, і їх інактивація обумовлена фоторозкладанням тирозинових і цистинових залишків.

Ліпіди поглинають ультрафіолетові промені в короткохвильовій області ультрафіолету. Для ненасичених жирних кислот максимум поглинання знаходиться в області близько 200 нм. Основним фотохімічним ефектом дії ультрафіолетових променів є окислення ліпідів. Квантовий вихід цієї реакції може істотно перевищувати одиницю із-за її ланцюгового механізму по вільнорадикальному механізму.

Фотореактивація. ДНК в клітині здатна відновлюватися від основного індукованого ультрафіолетовими променями пошкодження – піримідинових димерів. Цей процес відбувається в темноті і називається **темною реактивацією** (рис. 5.14). Відбувається він і на світлу шляхом **фотореактивації**. Вона полягає в тому, що під впливом видимого світла відбувається розпад піримідинових димерів ДНК, і клітки таким шляхом відновлюються від ураження. Фотореактивація відрізняється дуже високою ефективністю, про яку побічно можна су-

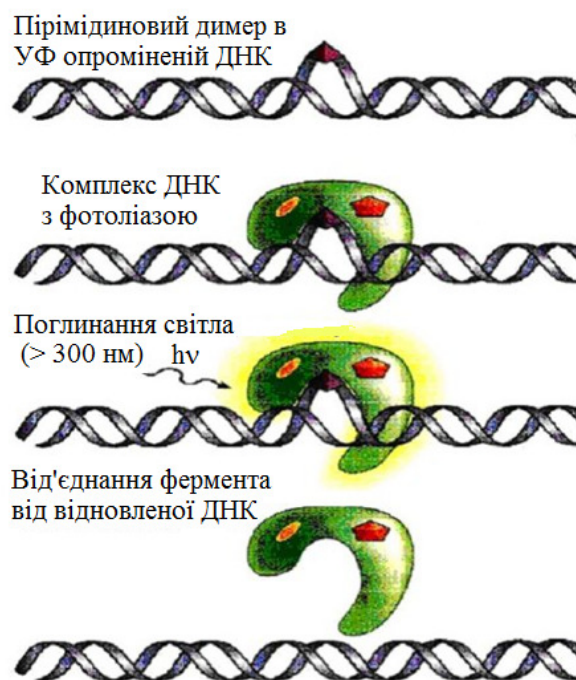
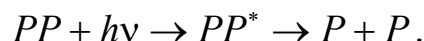


Рис.5.14. Механізм фотореактивації

дити по збільшенню виживання клітин, опромінених ультрафіолетовим випромінюванням, а потім підданих дії фотореактивуючого світла.

Під впливом світла відбувається пряме фоторозщеплення піримідинових димерів під впливом світлозалежного ферменту, так званого фотореактивуючого ферменту, **фотоліазою**. Фотоліаза здатна знаходити в ДНК піримідинові димери і утворювати з ними комплекс. При поглинанні кванта фотореактивуючого світла цей комплекс розпадається, і ДНК, що звільняє при цьому, вже не містить димера. Роль фотоліази полягає в забезпеченні міграції енергії збудженого стану на один з піримідинів P в димер PP , що полегшує мономеризацію, що відбувається відповідно до реакції



Інша гіпотеза полягає в тому, що фотоліаза з піримідиновим димером утворює комплекс з переносом заряду, чим і полегшує розпад димера.

Фотореактивация кліток – це широко поширене явище, що виявляється у бактерій, дріжджів, в клітках вищих рослин, тварин і людини.

Фотозахист. Стійкість кліток до ультрафіолетових променів підвищується, якщо перед опромінюванням їх піддати дії видимого або довгохвильового ультрафіолетового світла. Така дія світла називається **фотозахистом**. Вона найчастіше спостерігається у мікроорганізмів. Спектр дії фотозахисту представляє досить вузьку смугу з максимумом 310-340 нм. Механізм фотозахисту, пов'язаний з гальмуванням ділення клітин, обумовлений фотодеструкцією речовин хіноної природи. У еукариотичних клітинах виявлений ефект фотозахисту без гальмування ділення клітин. Пов'язують його з фотоіндукованим синтезом серотоніну з триптофану. Оскільки серотонін є сполука, що взаємодіє з ДНК шляхом інтеркалювання (зворотна вставка молекули або групи в проміжок між двома іншими молекулами або групами.), він стерично змінює умови фотоутворення піримідинових димерів, зменшуючи їх квантовий вихід.

Фотосенсибілізація. Іноді фотопошкодження молекул можуть бути викликані не безпосереднім поглинанням випромінювання даною молекулою, а її взаємодією з іншою молекулою, що поглинула квант світла і перейшла в збуджений стан. Сполуки, що підвищують чутливість біологічних об'єктів до світла, називаються **фотосенсибілізаторами**, а викликані ними реакції – **фотосенсибілізованими**.

Багато організмів містять природні пігменти, що поглинають світло певних довжин хвиль, що додає їм підвищену чутливість до сонячних променів. Така фоточутливість кліток може приводити до сильних світ-

лових пошкоджень, тоді як клітки, що не містять цих пігментів, без якого-небудь збитку переносять дію світла. Фотосенсибілізатори підрозділяються на ендогенні (що синтезують самим організмом) і екзогенні (що потрапляють в нього ззовні). Відомо чотири класи фотосенсибілізаторів: гіперицини, хлорофіли, порфірини і псоралени (фурокумарини).

Гіперицини – складні ароматичні сполуки, є продуктом нормального метаболізму в рослинах роду *Nuregium* (звіробій), деяких видів грибів і у простих. Пігменти групи гіперицинів є фотоокислювальними сенсибілізаторами, і за наявності кисню вони служать причиною загибелі кліток під дією сильного світла.

Хлорофілли обумовлюють фотодинамічний ефект у мутантних клітинах, позбавлених каротиноїдів.

Порфірини – циклічні сполуки, що складаються з чотирьох пірольних кілець, сполучених метиновими містками. Вони широко поширені в клітках аеробного метаболізму.

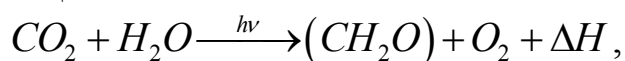
Псоралени (фурокумарини) є трициклічними сполуками, що є спареними кумариновими і фурановим кільцями. Псоралени знаходяться у ряді рослин (петрушка, лимон, інжирне дерево, боби, жовтець, лобода і ін.) Потрапляння екстракту з таких рослин супроводжується появою опіків при опромінюванні світлом. Псоралени, приєднуючись до піримідинів, виступають як сенсибілізатори ДНК, чим пояснюється їх канцерогенна дія.

Розділ 6. ФОТОСИНТЕЗ

6.1. Загальні поняття

Пігменти рослин, поглинаючи кванти сонячних променів, перетворюють їх енергію в енергію розділених зарядів, що приводить до формування хімічних зв'язків високоенергетичних з'єднань. Цей фотобіологічний процес називається **фотосинтезом**. Окрім накопичення енергії, фотосинтез супроводжується виділенням молекулярного кисню, що утворюється при фоторозкладанні води. Фотосинтез – складний і багатостадійний процес. Для його здійснення необхідна структурна організація молекулярних і клітинних структур, наявність спеціальних біохімічних систем.

Сумарна реакція фотосинтезу. Фотосинтез зелених рослин описується підсумковою реакцією:



де $\Delta H = 470$ кДж/моль – енергія, що запасається; (CH_2O) або

$\left(\begin{array}{c} | \\ H - C - OH \\ | \end{array} \right)$ – елемент складніших молекул вуглеводнів, що виникають

при фотосинтезі. За цим загальним рівнянням ховаються багато реакцій, які можна розділити на три стадії:

- 1) **фотохімічна стадія фотосинтезу**: поглинання кванта світла пігментом, міграція енергії збудженого стану до речовин, здатних до обернених окислювально-відновних реакцій;
- 2) **транспорт електрона** супроводжується синтезом високо відновних і макроергічних сполук;
- 3) **біологічна стадія** – протікання темнових реакцій, в яких відбувається відновлення CO_2 до $HCOH$, а також інших процесі подальшого перетворення первинних продуктів фотосинтезу і відновлення біохімічної системи.

Порівняння енергії 1 моля фотонів з довжиною хвилі 650 нм (складає 184 кДж) з тепловим ефектом реакції 470 кДж/моль говорить про те, що одного кванта світла даної довжини хвилі недостатньо, щоб здійснилася фотосинтетична реакція відновлення молекули CO_2 .

Фотосинтез в зелених рослинах означає реакцію між окислювачем CO_2 і відновником H_2O , в якій відбувається перенос 4 атомів водню. Максимальна швидкість фотосинтезу при постійному освітленні дорівнює одній молекулі O_2 на молекулу хлорофілу за 50 с.

Фотосинтез не завжди супроводжується виділенням кисню. Для деяких фотосинтезуючих бактерій донором водню служать інші воднемісткі речовини (ефіри органічних кислот, кислоти, неорганічні сполуки сірки).

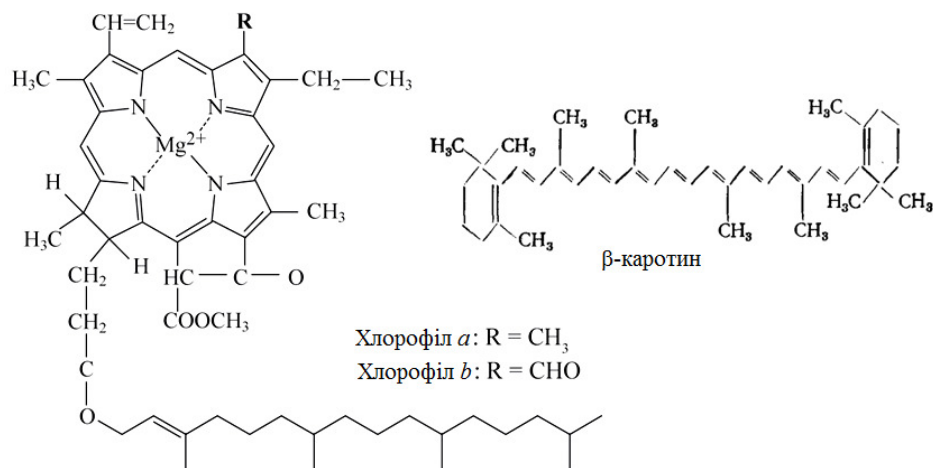
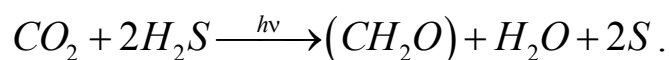


Рис. 6.1. Молекули хлорофілів і β-каротина

Наприклад:



У вищих рослинах основними пігментами, що поглинають світло і беруть участь у фотосинтезі, є хлорофіли *a* і *b*, каратиноїди. Хлорофіли відносяться до порфіринів, в основі яких лежить порфін – структура, що складається з чотирьох пірольних кілець, об'єднаних метиновими містками (рис. 6.1) В центрі тертапірола включений атом магнію. У хлорофілу *a* в положенні атома 3 другого пірольного кільця приєднана група CH₃, а у хлорофілу *b* – CONH.

На рис. 6.2. представлені спектри поглинання і флуоресценції хлорофілу в розчині. Дві смуги поглинання хлорофілу відповідають переходам $S_0 \rightarrow S_1$ і $S_0 \rightarrow S_2$. Перший перехід спостерігається в червоній області світла, другий, – в синій (смуга Core). Як було раніше відмічено, міжмолекулярні взаємодії хлорофілу з його оточенням приводять до зміни спектрів поглинання і флуоресценції. Саме по цих зсувах спектрів і судять про стан пігменту.

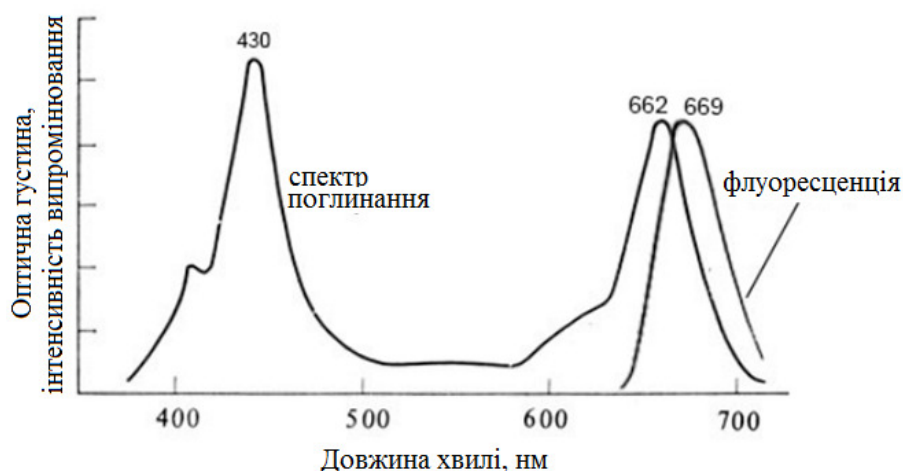


Рис. 6.2. Спектр поглинання і флуоресценції розчину хлорофілу.

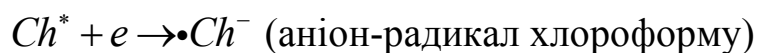
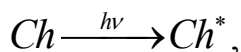
Окрім хлорофілів у фотосинтезі беруть участь і каратиноїди. До цих

пігментів відносяться α - і β -каротин. Вони, як збирачі світла, поглинають світло в синій області спектру і здатні передавати енергію електронно-збудженого стану хлорофілу *a*. Зворотний процес (передача енергії від хлорофілу до каратиноїдів) неможливий. Каратиноїди не володіють здібністю до флуоресценції. Вони таким чином захищають фотосинтетичний апарат від пошкодження сильного світла.

Фотосинтетичні пігменти зосереджені в спеціальних мембранних утвореннях у вигляді сплюснених бульбашок (*тилакоїдах*), що формуються з подвійної ліпідної мембрани, що містить білки. На рівні тканин листа також є багато пристосувань, потрібних для транспорту CO_2 до фотосинтезуючих клітин, виділення з фотосинтезуючих систем продуктів реакції.

6.2. Фотохімічні стадії фотосинтезу

Первинна фотохімічна реакція фотосинтезу – це обернене окислювально-відновне перетворення хлорофілу (реакція Красновського, 1948). Квантовий вихід реакції фотовідновлення хлорофілу складає $2 \cdot 10^{-2}$ в етанол-водно-піридінових і $7 \cdot 10^{-2}$ у водно-піридінових розчинах. Реакція Красновського протікає в декілька стадій:



У присутності кисню і інших окислювачів відбувається обернена реакція.

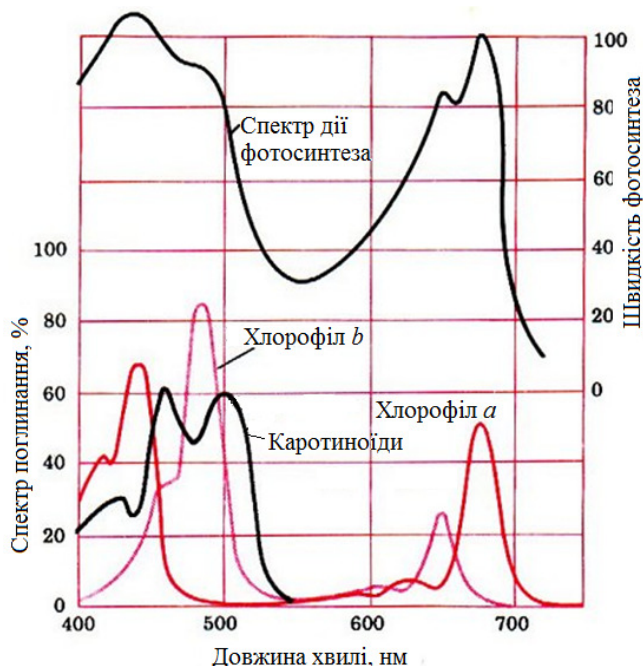


Рис. 6.3. Спектр дії фотосинтезу

Спектр дії фотосинтезу – крива залежності інтенсивності фотосинтезу від довжини хвилі падаючого світла. Ця залежність дає зрозуміти при якій довжині хвилі світла найефективніше протікають фотохімічні реакції фотосинтезу. Хлорофіл набагато ефективніше поглинає червону і синю частини спектру, які найбільш ефективні для здійснення фотосинтезу. Тому на графіку спектру дії присутні два піки в червоній і синій області. Спектр дії фотосинтезу типового фотосинтезуючого організму формою повторює підсу-

мовувані спектри поглинання його основних (хлорофіли, бактеріохлорофіли) і допоміжних пігментів (каротиноїди, фікобіліни).

Для спектру дії характерне "червоне падіння" – різке зменшення поглинання в області 680 нм (рис. 6.3.). Але при цьому хлоропласти продовжують поглинати світло. Пояснення дає **ефект Емерсона**: світло, неефективне в далекій області, стає ефективним при одночасному освітленні системи більш короткохвильовим світлом, наприклад при комбінованій дії світлом з 700 і 650 нм. Іншими словами при деяких комбінаціях довжин хвиль монохроматичних променів при сумісному освітленні рослин ефективність фотосинтезу істотно вища, ніж при їх роздільному освітленні:

$$I_{\lambda_1} + I_{\lambda_2} \leq I_{\lambda_1 + \lambda_2}.$$

Також відомий **ефект Блінка**, що полягає в різкому посиленні інтенсивності фотосинтезу у момент заміни довгохвильового світла більш короткохвильовим.

Для повної ефективності фотосинтезу потрібне поглинання одного кванта хлорофілом *a* і іншого – допоміжним пігментом. Червоне падіння відбувається в області, в якій світло поглинає тільки *Ch_a* (максимум при 680 нм).

Одним з пояснень описаних ефектів полягає в тому, що повний процес фотосинтезу здійснюють дві системи з різним спектром дії. Так виникло уявлення про фотосистему I з реакційним центром, що поглинає більш довгохвильове випромінювання в області 700 нм (позначають P_{700}), і про фотосистему II, реакційний центр якої представлений пігментом, що поглинає в області 680 нм (P_{680}).

Кожна з фотосистем включає фотохімічно неактивні пігменти-світлозбірники (100 – 1000 молекул), фотохімічно активний хлорофіл (1-2 молекули), реакційний центр і переносники електронів. Реакційними центрами (пастки мігруючої енергії першою і другим фотосистемами) є дискретні форми хлорофілу *a*, які є P_{700} і P_{680} .

Для опису фотосинтезу була запропонована схема взаємодії фотосистем I і II (ФС I та ФС II). Зазвичай ця схема зображається у такому вигляді, що нагадує перевернуту букву Z. Тому її називають **Z-схемою фотосинтезу** (рис. 6.4). Її суть полягає в наступному.

Світлозбираючий комплекс ФС I містить 200 молекул хлорофілу *a*, 100 молекул хлорофілу *b*, 50 молекул каротиноїдів і 2 молекули феофітину. Реакційний центр ФС II є пігмент-білковий комплексом, розташованим в тилакоїдних мембранах і оточений світлозбираючим комплексом. У ньому знаходиться димер хлорофілу *a* з максимумом поглинання при 680 нм (P_{680}). На нього врешті решт передається енергія кванта світла зі світлозбираючого комплексу, внаслідок чого один з електронів переходить на вищий енергетичний стан, зв'язок його з ядром ослабляється, і збуджена

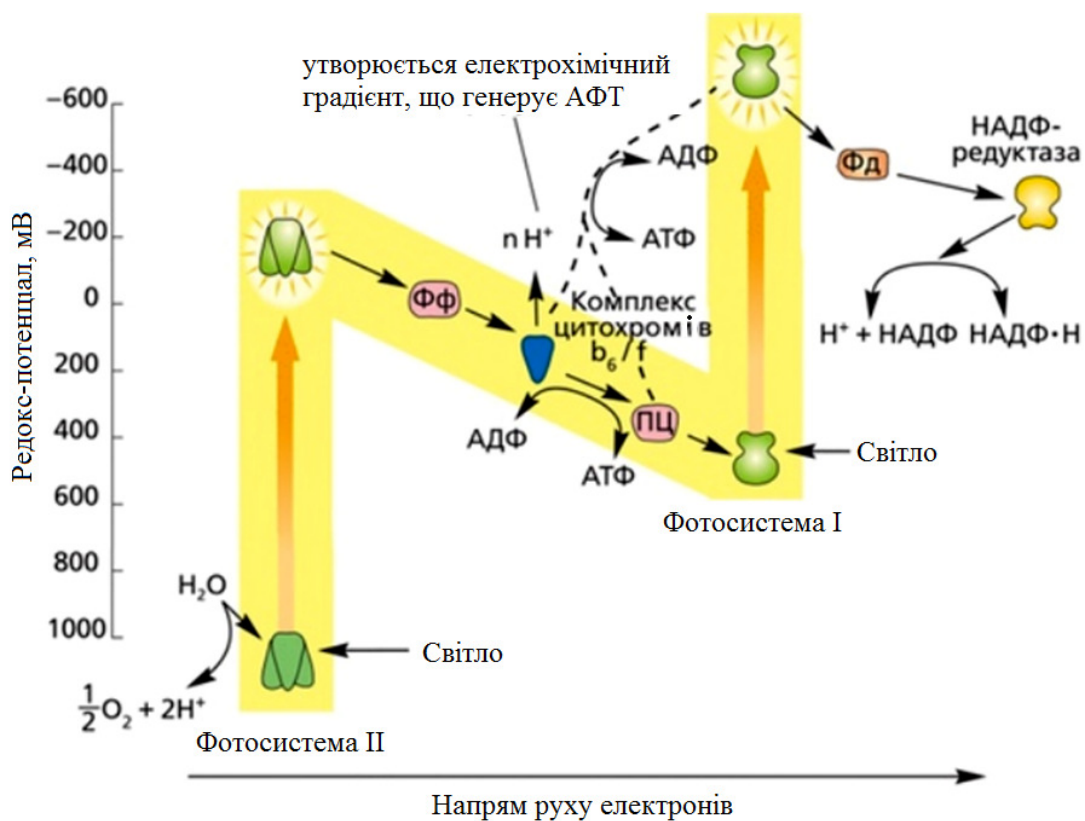


Рис. 6.4. Z-схема фотосинтезу

молекула P_{680} стає сильним відновником.

Поглинання кванта світла в системі хлорофілу фотосистеми II супроводжується міграцією електронного збудження до реакційного центру. Вакансія, що виникає в реакційному центрі, характеризується великою спорідненістю до електрона, у зв'язку з чим вона може взаємодіяти з донорами електронів. Фотовідновлення реакційного центру відбувається за рахунок електрона, що відривається від молекули води. Вода є донором електрона в реакційному центрі фотосистеми II.

При фотозбудженні пігменту реакційного центру фотосистеми I електрон у збудженому стані передається ферредоксину, а потім – НАДФ (рис. 6.4, 6.5). Утворенням відновленої форми $\text{НАДФ} \cdot \text{H}_2$ завершується функціонування фотосистеми I.

P_{680} відновлює феофітин, надалі електрон переноситься на хінони, що входять до складу ФС II і далі на пластохінони, що транспортуються у відновленій формі до комплексу b_6f . Одна молекула пластохінона переносить 2 електрони і 2 протони, які беруться зі строми.

b_6f -комплекс – це насос, що перекачує протони із строми у внутрішньотілакоїдний простір і створює градієнт їх концентрації за рахунок виділеної в окислювально-відновних реакціях електронотransпортного ланцюга енергії.

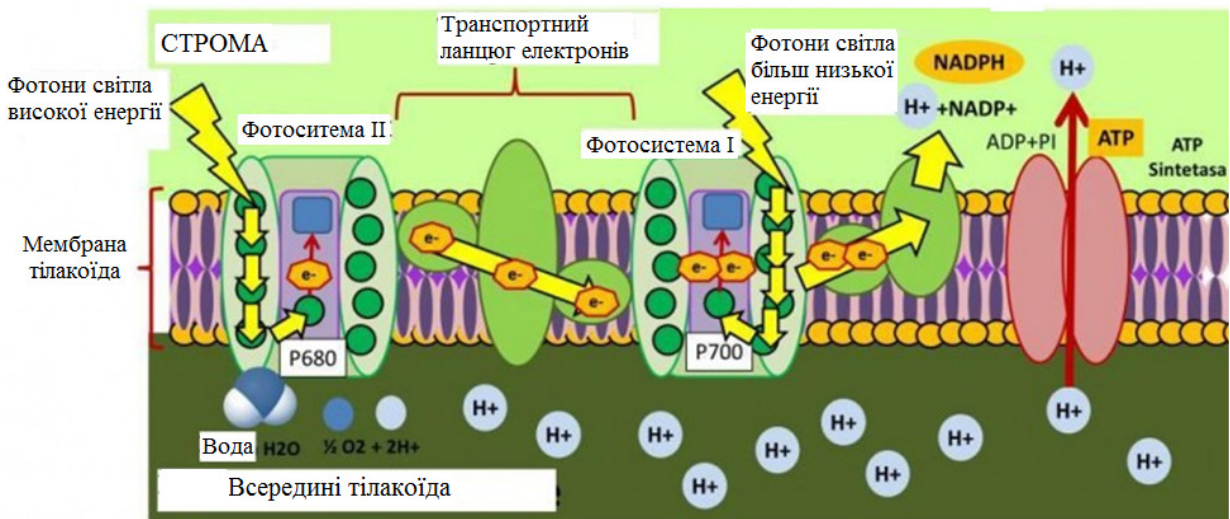


Рис. 6.5. Потік електронів при фотосинтезі

Заповнення електронної вакансії в молекулі P_{680} відбувається за рахунок води. До складу ФСІІ входить водоокислюючий комплекс, що містить в активному центрі 4 іони марганцю. Для утворення однієї молекули кисню потрібно дві молекули води, що дають 4 електрони. Тому процес проводиться в 4 такти і для його повного здійснення потрібно 4 кванти світла. Комплекс знаходиться з боку внутрішньотілакоїдного простору, і отримані 4 протони викидаються в нього.

Таким чином, **сумарний результат роботи ФС ІІ** – це окислення 2 молекул води за допомогою 4 квантів світла з утворенням 4 протонів у внутрішньотілакоїдному просторі і 2 відновлених пластохінонів в мембрані.

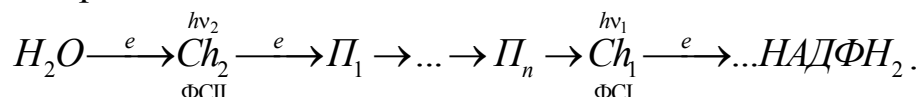
Світлозбираючий комплекс ФС І містить приблизно 200 молекул хлорофілу. У реакційному центрі ФС І знаходиться димер хлорофілу *a* з максимумом поглинання при 700 нм (P_{700}). Після збудження квантом світла він відновлює первинний акцептор – хлорофіл *a*, хлорофіл *a* – вторинний (вітамін K_1 або філохінон), після чого електрон передається на ферредоксин, який і відновлює НАДФ за допомогою ферменту ферредоксин-НАДФ-редуктази.

Електрон, видалений з молекули P_{700} фотосистеми І, заміщується електроном, який переміщався вниз від первинного акцептора електронів фотосистеми ІІ. Таким чином, на світлі відбувається безперервний потік електронів від води до фотосистеми ІІ, до фотосистеми І, до НАДФ+ (рис. 6.5). Енергія, відновлена на цих етапах, представлена молекулою АТФ (утворення якої вивільняє молекулу води) і НАДФН, які потім перетворюються в основні джерела енергії для відновлення вуглекислого газу. Для генерації однієї молекули НАДФН необхідно поглинути 4 протони: 2 фотосистемою ІІ і 2 фотосистемою І.

Таким чином, основна функція фотосистеми ІІ – генерація сильного

окислювача, який індукує процес окислення води і переносу її електронів на мембранний переносник. Основна функція фотосистеми I – наситити ці низькорівневі електрони енергією, щоб з їх допомогою здійснити відновлення НАДФ+. Оскільки енергія сумарного процесу дуже велика, щоб здійснити його в рамках одного реакційного центру, в ході еволюції з'явилися дві фотосистеми, які розділено здійснюють різні частини цієї реакції.

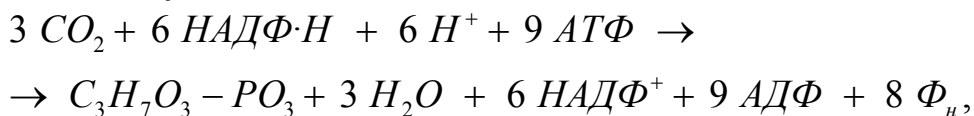
Спільна діяльність фотосистем забезпечує не одноактний, а двоактний підйом електрона:



На **другій стадії фотосинтезу** енергія використовується для відновлення вуглецю. Вуглець доступний для фотосинтезуючих клітин у формі діоксиду вуглецю. У рослин двоокис вуглецю досягає фотосинтезуючих кліток через спеціалізовані отвори листя і зелених стебел.

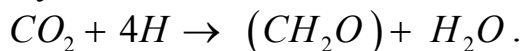
На цій другій стадії фотосинтезу, АТФ і НАДФН, сформовані на першій стадії, використовуються для відновлення вуглецю з діоксиду вуглецю до простого цукру. Потім хімічна енергія, що тимчасово зберігається в молекулах АТФ і НАДФН, передається відповідним молекулам для транспортування і зберігання енергії в клітках водоростей або органів рослин. Результатом цього процесу є формування вуглецевого скелета, з якого потім можуть бути побудовані і інші органічні молекули.

Реакції фіксації вуглецю проходять в умовах, які не вимагають світла, але деякі ферменти регулюються ним і проводяться в стромі за допомогою **циклу Кальвіна**. НАДФН і АТФ, утворені в реакціях, які поглинають світлову енергію, використовуються для відновлення вуглекислого газу. Цикл проводить гліцеральдегід фосфат, з якого може бути сформована глюкоза і інші органічні сполуки:



де Φ_n – неорганічний фосфат.

Сумарна реакція циклу



Первинні стадії фотосинтезу, починаючи з поглинання кванта і кінчаючи його захопленням в реакційному центрі, протікають за час, що не перевищує 100 нс, що істотно нижче за характерні часи флуоресценції молекул фарбників. Така швидка міграція енергії забезпечує високий (більше 90%) квантовий вихід первинного процесу фотосинтезу.

Виходячи з того, що для здійснення реакції фотосинтетичного засвоєння CO_2 потрібно 4 електрони, на переносі кожного з них витрачається по два кванти світла, то процес фотосинтезу є 8-квантовим. Коефіцієнт корисної дії фотосинтезу зелених рослин не перевищує 25 %. Спрощена Z-

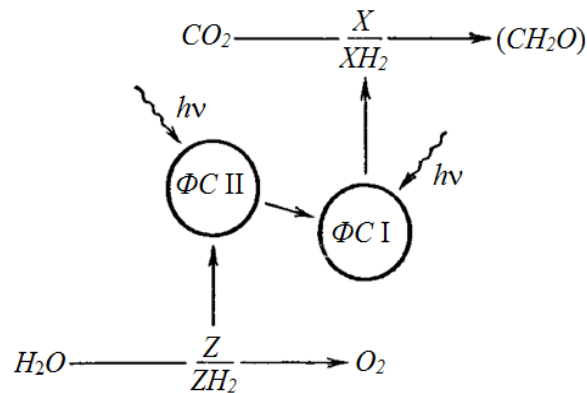


Рис. 6.6. Спрощена Z-схема фотосинтезу: ферментативне перетворення H_2O в O_2 ; перенос водню від проміжної сполуки Z/ZH_2 до X/XH_2 ; ферментативне перетворення CO_2 в (CH_2O) .

схема фотосинтезу представлена на рис. 6.6.

Розділ 7. БІОФІЗИКА ЗОРУ

7.1.Будова ока

Механізм генерації зорового відчуття є фотобіологічним процесом. Око має не зовсім правильну сферичну форму. Світло потрапляє в око через рогівку (показник заломлення $n = 1.376$), потім через кришталік. Кришталік складається з пластинчастих шарів, неоднакових як за радіусом кривизни, так і показнику заломлення (1.414 – 1.424). Простір між рогівкою і кришталіком заповнений водянистою вологою, а внутрішня частина ока – склоподібним (склистим) тілом – прозорою гелевидною масою (показник заломлення $n = 1.336$), що складається з позаклітинної рідини з колагеном і гіалуроновою кислотою в колоїдному розчині.

Внутрішній шар ока, що містить зорові елементи, називається сітківкою. До сітківки підходить зоровий нерв, що відводить нервові імпульси в зоровий центр головного мозку. В області примикання зорового нерва до сітківки знаходиться нечутлива до світла сліпа пляма, а в середині сітківки – жовта пляма, де при денному світлі максимальна гострота зору.

Шар світлочутливих кліток сітківки складається з паличок і колб. Палички мають довжину 63–81 мкм, діаметр – 1.8 мкм; для колбочок ці параметри рівні відповідно 35 і 5–6 мкм. Щільність розміщення паличок на різних ділянках сітківки ока нерівномірна і може складати від 20 до 200 тисяч на квадратний міліметр. Палички (близько 125 млн) розташовуються по всій поверхні напівсферичної сітківки і відповідають за чорно-білий, або смерковий, зір. Колби (близько 6.5 млн) в основному зосереджені в центральній частині сітківки і відповідають на кольоровий зір при достатньо яскравому освітленні.

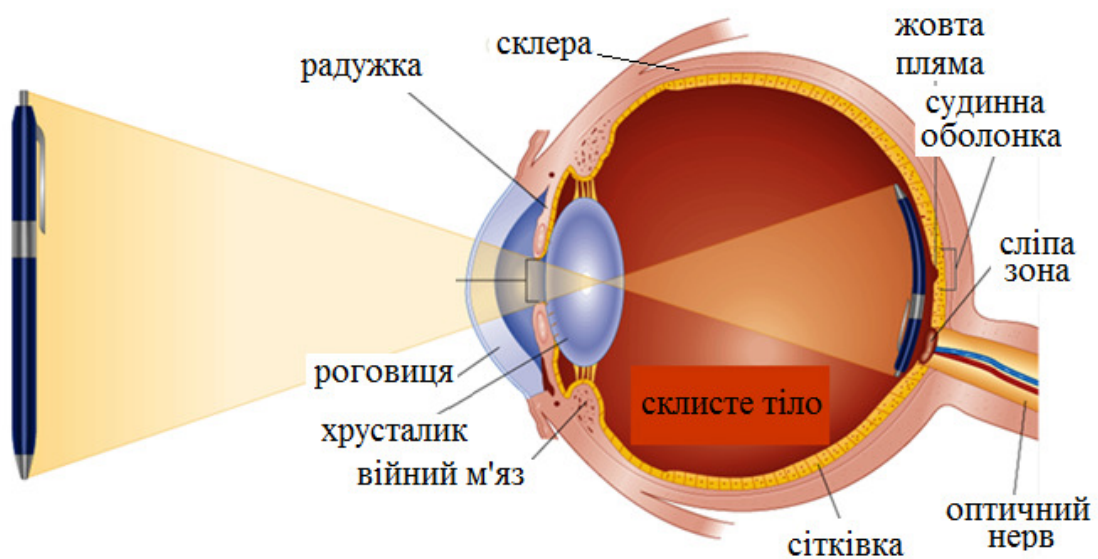


Рис. 7.1. Будова ока

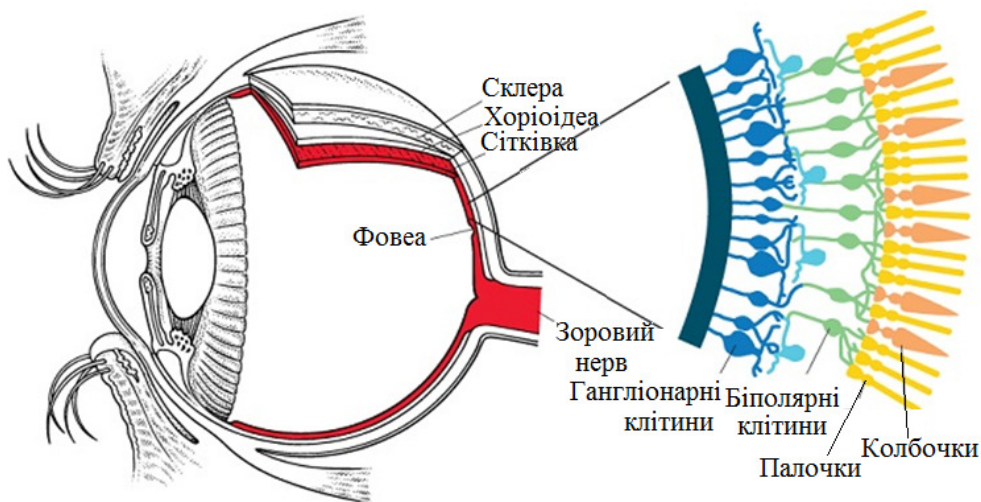


Рис. 7.2 Будова сітківки

Перш ніж світло потрапить на палички або колби, він повинен пройти через декілька шарів нервових клітин. Палички і колби орієнтовані до світла своїм внутрішнім сегментом, що не містить зорового пігменту. Проте внутрішні сегменти прозорі для видимого світла.

Найменша кут зору, при якому людина ще здатна бачити окремо дві різні точки предмету (кутова роздільна здатність), складає одну кутову хвилину. При розташуванні предмету на відстані 25 см лінійна роздільна здатність людського ока складає 70 мкм, а розмір зображення цих точок на сітківці – 5 мкм, що дорівнює середній відстані між колбами.

Абсолютний поріг чутливості зору людини (мінімальна енергія світлового імпульсу, що виявляється, при відсутності світлового фону в умовах повної світлової адаптації) на поверхні рогівки ока відповідає 58-148 квінтам синьо-зеленого світла. Тільки 5-15 квантів поглинаються молекулами зорового пігменту в паличках сітківки, а залишок втрачається (4% – віддзеркалення від рогівки, 50% – поглинання оптичними середовищами ока, 35% – поглинання пігментного епітелію). Пігментний епітелій, що підстилає сітківку, зменшує кількість відбитого і розсіяного від задньої стінки ока. Всі 15 квантів при пороговій інтенсивності поглинаються різними паличками.

Чутливість палички достатня, щоб зареєструвати падіння навіть 2-3 фотонів.

Не дивлячись на це, фоторецептори на їх освітлення відповідають так, ніби між ними є зв'язок. При освітленні одного рецептора відбувається його гіперполяризація. Якби не було зв'язків між фоторецепторами, то таку дію давав би єдиний фоторецептор сітківки людини, що відреагував. Проте, досліді показують, що сусідні рецептори теж гіперполяризуються. Вірогідне пояснення цього парадоксу полягає в тому, що колби центральної ямки розташовані дуже щільно, і зміна мембранного потенціалу одного фоторецептора перетікає на сусідні.

Таблиця 7.1. Відмінності між паличками та колбочками

Палички	Колбочки
Використовуються для нічного зору (в умовах слабкої освітленості)	Використовується для денного зору (в умовах високої освітленості)
Високочутливі, сприймають і розсіяне світло	Не дуже чутливі до світла; реагують тільки на пряме світло
Низька чутливість зору	Висока гострота зору; краще просторове розподільна здатність
Немає в центральній ямці	Зосереджені в центральній ямці
Уповільнена реакція на світло	Швидка реакція на світло, можуть сприймати більш швидкі зміни у збудника
Мають більше пігменту, чим колбочки	Мають менше пігменту
Мембранні диски не прив'язані безпосередньо до клітинної мембрани	Мембранні диски кріпляться до зовнішньої мембрани
В 20 раз більше, ніж колбочок, по кількості	
Один тип фоточутливого пігменту	Три типа фоточутливих пігментів у людини

7.2. Будова і функції паличок

Паличка складається з внутрішнього і зовнішнього сегментів, пов'язаних між собою тонкою сполучною ніжкою, або вією. Внутрішній сегмент, що включає внутріклітинну органелу (мітохондрії, рибосоми та ін.), переходить в ядерно-плазматичне тіло, базальна частина якого забезпечена пресинаптичним закінченням, вступаючим в контакт з біполярними нервовими клітинами. Ніжка грає важливу роль в транспорті метаболітів (білки, АТФ і т. д.), які потрібні для оновлення і функціонування зовнішнього сегменту. Зокрема, через ніжку в зовнішній сегмент переноситься родопсин, що синтезується рибосомами внутрішнього сегменту. Зовнішній сегмент виконує функцію фоторецептора клітки. Він заповнений стопкою дисків, орієнтованих перпендикулярно до довгої осі клітки. У зовнішніх сегментах паличок хребетних міститься близько 1000 – 2000 дисків. Диск є подвійною мембраною із замкнутим внутрішнім простором. Диски як би плавають в цитоплазмі зовнішнього сегменту і, мабуть, не пов'язані із зовнішньою мембраною палички.

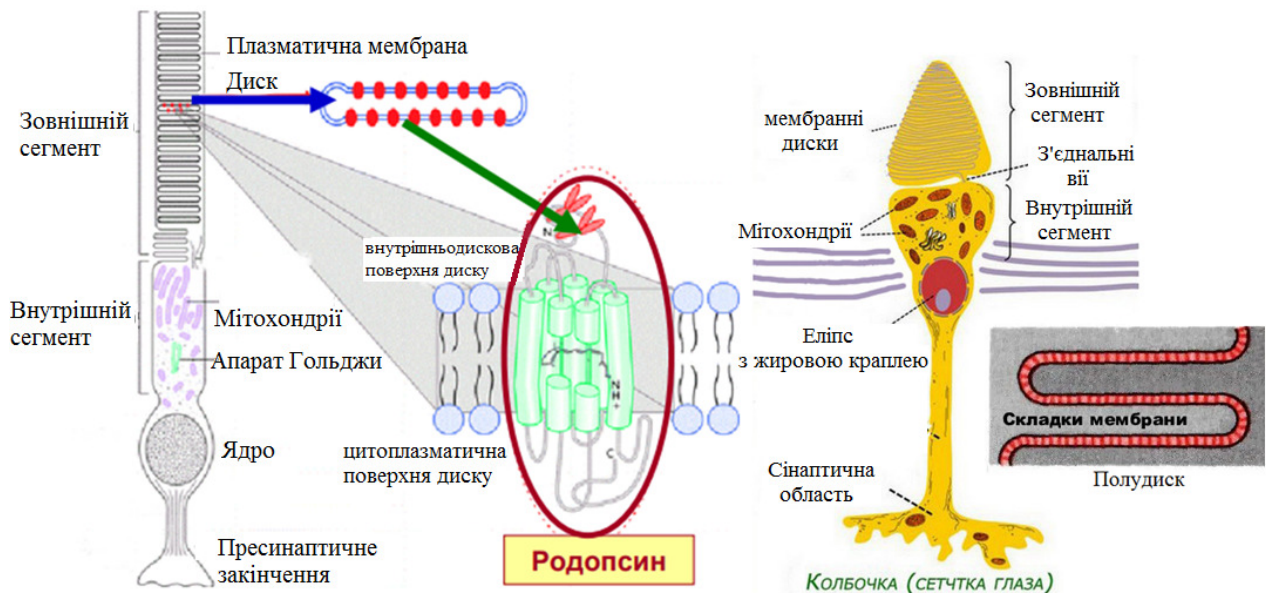


Рис. 7.3. Будова палички та колбочки

Мембрани дисків містять безліч молекул світлочутливого пігменту родопсину. Дискамі є мембранні сплюснені мішечки, укладені у вигляді стопки. Повернута до світла, зовнішня частина стовпчика з дисків, постійно оновлюється, за рахунок **фагоцитозу** "засвічених" дисків клітками пігментного епітелію, і постійного утворення нових дисків, в тілі фоторецептора. Диски постійно оновлюються (до сотні дисків в добу). На повне оновлення всіх дисків фоторецептора потрібно близько 10 днів.

Зоровий пігмент паличок родопсин зосереджений в зовнішніх сегментах паличок, де він вбудований в зорові диски. Молекули родопсину, пронизують ліпідний біслої мембран зорових дисків. Хромофорна група розташована так, що вектор дипольного моменту електронного переходу виявляється паралельним площині дисків, тобто перпендикулярним напрямку руху падаючих фотонів (вірогідність поглинання максимальна). Низька в'язкість ліпідного шару обумовлена високим вмістом поліненасиченої докозагексенової жирної кислоти (6 ненасичених подвійних зв'язків). Це сприяє дифузії молекул пігменту в мембрані.

Родопсин – зоровий пігмент, що є складним білком. Він складається з глікопротеїдної частини – **опсина** і хромофорної групи – **ретиналя** (половини молекули β -каротина). Ретиналь може мати декілька просторових ізомерів. Вся сукупність фотохімічних перетворень заснована на двох явищах:

- 1) Ретиналь під дією світла здатний переходити в різні цис-транс ізомери, найбільш важливі з яких 11-цис- і повністю транс-ретиналь.
- 2) Тільки 11-цис-ретиналь відповідає центру скріплення ретиналя на опсине і утворює з ним міцний комплекс. З іншими ізомерами комплекс хромофор-білок не готується.

Ізольований ретиналь має максимум поглинання в області 370 –

380, а опсин – в області 278 нм. Їх взаємодія зміщує максимум спектру поглинання родопсину у видимому діапазоні в область 500 нм. Це явище називається батохромним зрушенням.

Він може бути обумовлений рядом причин: протонуванням азоту в альдимінній групі, взаємодією ретиналя з SH-групами опсина, слабкими міжмолекулярними взаємодіями ретиналя з білком. Ірвінг вважає, що основною причиною сильного батохромного зміщення в спектрі поглинання ретиналя є висока локальна поляризуємість середовища навколо хромофора.

Родопсин також має ще один максимум поглинання на довжині хвилі 350 нм (ультрафіолетова область). Завдяки переважному поглинанню зелених і блакитних променів, ізольований родопсин має червоний колір. Спектр поглинання паличок співпадає зі спектром поглинання родопсину і близький до кривої спектральної чутливості сутінкового зору.

7.3. Фотоперетворення родопсину

Молекула ретиналя містить довгу систему зв'язаних подвійних зв'язків, а оскільки обертання навколо подвійного зв'язку неможливе, то молекула хромофора плоска. Поглинання світла ретином приводить до $\pi-\pi^*$ -електронному переходу. Після поглинання фотона π -зв'язок розривається і дві частини молекули ретиналя повертаються навколо σ -зв'язок.

Повернення молекули в основний стан відбувається в одній з двох точок виродження, коли енергія основного і збудженого станів рівні, після чого молекули знову стає плоскою. Фотоізомеризація обернена і в стаціонарних умовах встановлюється рівноважне відношення концентрацій цис- і транс-форм ретиналя. Накопичуватися буде та форма, яка володіє найменшим поглинанням в спектральній області діючого світла. Явище фотооборотності не дозволяє відбутися повному переходу 11-цис в повністю транс-форму ретиналя при будь-яких інтенсивностях світла. У той же час фотооборотність грає важливу роль в регенерації зорового пігменту.

У живому оці, разом з розкладанням зорового пігменту, постійно йде і процес його регенерації (ресинтезу). При темновій адаптації цей процес закінчується тільки тоді, коли весь вільний опсин з'єднався з ретином.

Єдиною фотохімічною реакцією, яка приводить до появи відчуття світла, в зоровому рецепторі є фотоізомеризація 11-цис-ретиналя в повністю-транс-форму (рис. 7.4, 7.5). Після утворення транс-форми стерична відповідність хромофора і опсина порушується, а це приводить до цілої серії перебудов в молекулі білка, які супроводжуються змінами в

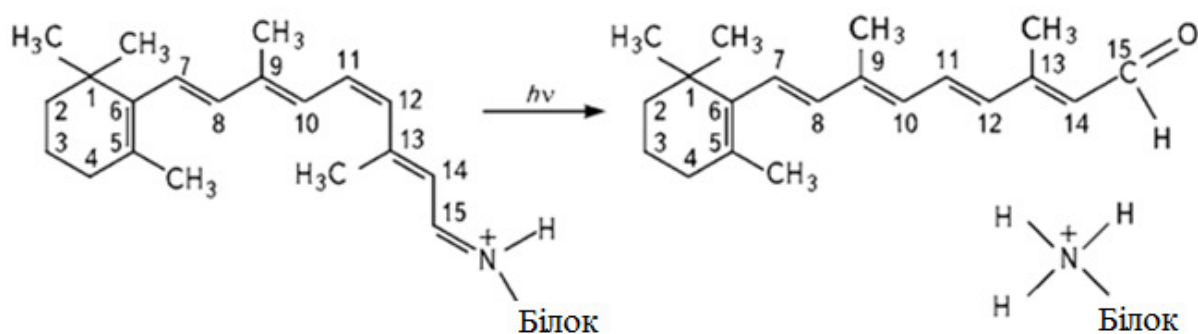


Рис. 7.4. Перетворення 11-цис-ретиналя в повністю цис-ретиналь

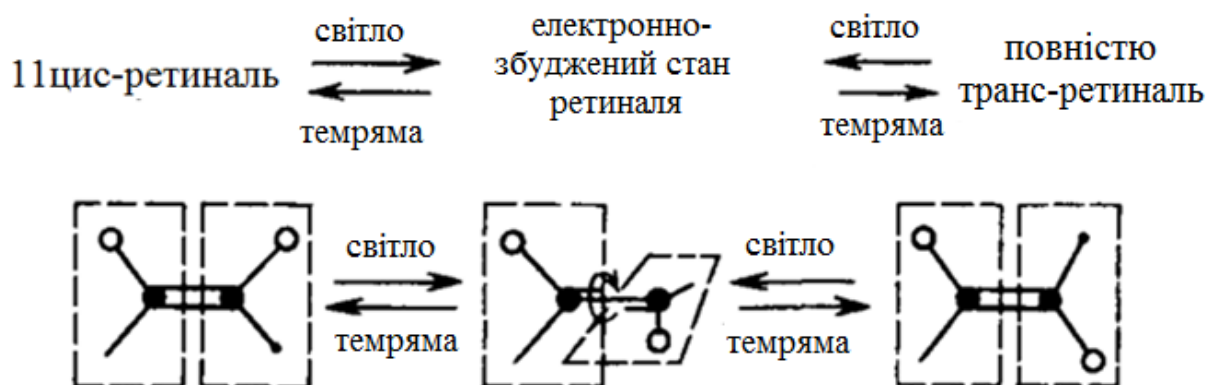


Рис. 7.5. Цис-транс-ізомеризація ретиналя під дією світла

спектрі поглинання зорового пігменту (Уолд, Нобелівська премія, 1966 г.). У дослідях Г. Уолда родопсин виділяли в темряві, потім заморожували в рідкому азоті (77 К) і опромінювали світлом. При подальшому нагріванні зразка до певних температур спостерігалися зміни спектрів поглинання із-за послідовних переходів родопсину в його похідні, що отримали спеціальні назви (рис.7.6). На цьому ж рисунку приведені виміряні методом імпульсного фотолізу часи конформаційних перетворень різних форм пігменту при кімнатній температурі. При цьому тільки перехід родопсин – батородопсин відбувається під дією світла, а решта стадій здійснюється в темряві. При кімнатній температурі тривалість існування кожної подальшої форми значно більше, чим попередніх. Кожна форма родопсину містить ретиналь в повністю транс-конформації і під дією квантів світла може регенерувати безпосередньо в родопсин. Вірогідність такої регенерації зростає зі збільшенням часу життя конформера, оскільки збільшується вірогідність зіткнення з ним квантів світла. Видно, що метародопсин II зі значно більшою вірогідністю може на світлі регенерувати в родопсин, чим метародопсин I, і т. д. Якщо родопсин освітити коротким спалахом світла і далі помістити в темряву, то можливість світлової регенерації родопсину усувається. В цьому випадку приблизно через 100 с відбувається розпад родопсину на опсин і транс-ретиналь. Регенерація родопсину в такій ситуації відбу-

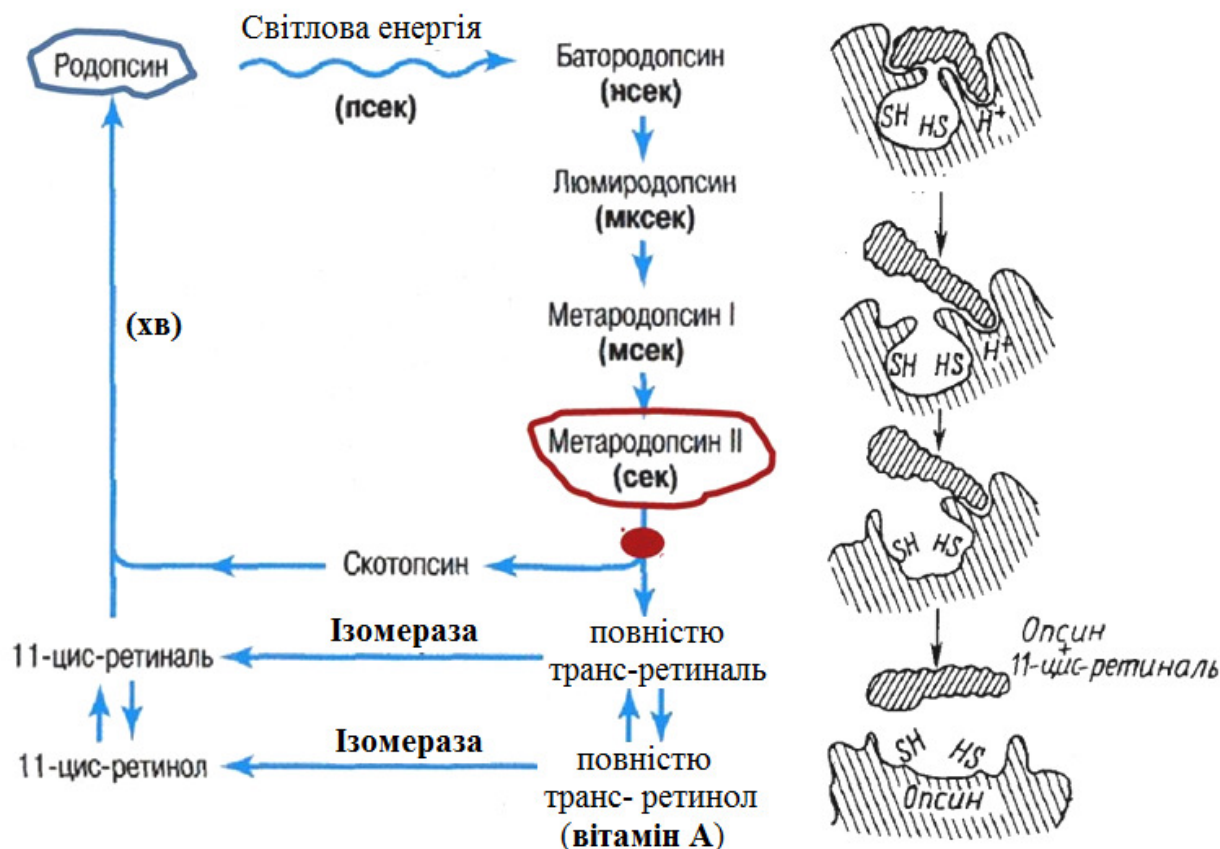


Рис.7.6. Ініціювання світлом конформаційних перебудов родопсину

ватиметься вже за участю ферментів. Фермент ізомераза переводить повністю транс-ретиналь в 11-цис-ретиналь, після чого відбувається його приєднання до опсину з утворенням родопсину. Але це шлях повільний, тому на світлі найбільша частина фоторегенерує і приведений ланцюжок конформаційних перетворень найчастіше не доходить до кінця.

7.4. Рецепторні потенціали і молекулярний механізм зору

Відразу після освітлення палички коротким спалахом світла спостерігається протягом ~ 1 мс ранній рецепторний потенціал (РРП), амплітуда якого росте зі збільшенням інтенсивності спалаху, але не перевищує 5 мВ. Потім через ~ 1 мс розвивається пізній рецепторний потенціал (ПРП). На мембрані цитоплазми зовнішніх сегментів паличок потенціал має знак (+) усередині і знак (–) зовні. Під дією світла відбувається розвиток деякої подібності потенціалу нервових клітин, але з протилежним знаком. По-друге, індукований світлом сигнал складається з двох фаз: РРП і ПРП, природа яких абсолютно різна. Мабуть, РРП пов'язаний з переміщенням молекул родопсину під час конформаційних перебудов, викликаних освітленням. На молекулі цього білка є фіксовані заряди, положення яких відносно біслоя ліпідів після поглинання квантів світла змінюється, що і є причиною РРП. Слід підкреслити, що у

виникненні РРП не беруть участь ніякі процеси зміни іонній проникності мембран. За РРП відповідальні конформаційні перетворення родопсину до стадії метародопсин II, оскільки саме вони відбуваються за час, порівнянний з тривалістю РРП. Після утворення метародопсину II починаються процеси абсолютно іншої природи, в яких вирішальну роль грає дифузія медіаторів в клітки і рух іонів через клітинну мембрану.

У зовнішніх сегментах паличок бика міститься близько 130 мМ Na^+ і 106–151 мМ K^+ . Частина іонів знаходиться у вільному стані, а частина пов'язана з фосфоліпідами мембрани. Іони Na^+ і K^+ у внутрішньодисковому, міждисковому і позаклітинному просторі розподілені нерівномірно. У внутрішньодисковому просторі багато K^+ і дуже мало Na^+ , а в міждисковому просторі, навпаки, мало K^+ і багато Na^+ . Зовнішня мембрана палички проникна для іонів Na^+ і Cl^- і мало проникна для іонів K^+ . Завдяки цьому по електрохімічному градієнту іони Na^+ входять в зовнішній сегмент.

В той же час концентрація іонів Na^+ не досягає рівноважного стану унаслідок їх виштовхування назовні за допомогою АТФ-ази, локалізованою у внутрішньому сегменті. Як наслідок, від внутрішнього до зовнішнього сегменту зовні палички тече темновий натрієвий струм. Петля струму проходить через перешийок палички за рахунок того, що калієвий струм тече в напрямі назовні у внутрішньому сегменті мембрани. Таким чином, зовнішня мембрана паличок в темноті деполяризована.

Освітлення приводить до значного зменшення проникності зовнішньої мембрани палички для іонів Na^+ і збільшенню її електричного опору. Вважається, що основною причиною цього може бути закриття Na^+ -каналів під впливом особливих медіаторів, що виділяються при конформаційних перебудовах мембран дисків. В результаті паличка гіперполяризується. Гіперполяризація приводить до зменшення вивільнення

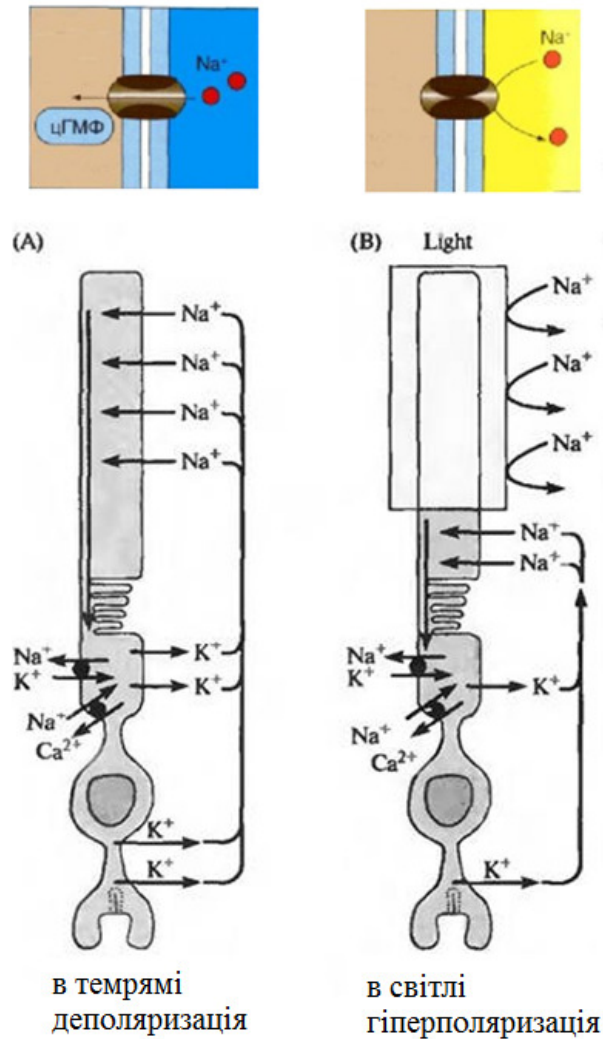


Рис. 7.7. Активація фоторецептора

медіатора. Концентрації натрію, калія і кальцію підтримуються всередині палички спеціальними насосами і іонообмінниками, розташованими в області внутрішнього сегменту.

Кожен поглинений квант викликає блокаду 100 – 300 натрієвих каналів. При збудженні змінюється тільки проникність мембрани для натрію, для інших іонів ця величина залишається на колишньому рівні. Тому в умовах блокади натрієвих каналів на перше місце виступають калієві. Дифузія K^+ назовні з клітки у бік меншої концентрації викликає появу там позитивного заряду, а в клітці, навпаки, – негативного.

Такими медіаторами, мабуть, можуть бути іони Ca^{2+} і циклічний гуанозинмонофосфат цГМФ. Зменшення проникності зовнішньої мембрани для іонів Na^+ , зниження їх вмісту в цитоплазмі у її внутрішньої поверхні приводять до гіперполяризації мембрани, характерної для стану спокою у нервових клітин. Хвиля гіперполяризації розповсюджується по зовнішній мембрані до базальної пресинаптичної ділянки палички, де відбувається збудження біполярних нервових клітин.

Один поглинений фотон, що індукує фотохімічну трансформацію однієї молекули родопсину, суттєво зменшує темновий струм в паличці – на 1–3%. Оскільки темновий струм відповідає входу в паличку близько 10^9 іонів Na^+ в секунду, це повинно означати, що одна фотохімічна подія супроводжується припиненням входу в зовнішній сегмент близько 10^7 іонів Na^+ . Виявлена також лінійність між зменшенням темнового струму і числом поглинених фотонів. При високих інтенсивностях спостерігається відхилення від лінійності аж до насичення натрієвого декременту при 200 поглинених паличкою фотонах.

Раніше вважалося, що після освітлення Ca^{2+} виходить з дисків, в яких він накопичувався в темноті. Було встановлено, що концентрація Ca^{2+} в дисках складає величину порядку $10^{-3}M$, а в міждисковому просторі – $10^{-6}M$; освітлення викликає збільшення концентрації Ca^{2+} в міждисковому просторі на величину $5 \cdot 10^{-7}$ – $10^{-6}M$, що відповідає в перерахунку на один поглинений фотон 3–300 іонам Ca^{2+} . Освітлення паличок приводило до виходу Ca^{2+} з кліток, це пояснили тим, що освітлення звільняє внутріклітинний зв'язаний кальцій, частина якого виходить назовні.

На даному етапі дотримуються наступної теорії. Родопсин відноситься до суперсімейства трансмембранних рецепторів GPCR (рецепторів, пов'язаних з G-білками). При поглинанні світла конформація білкової частини родопсину міняється, і він активує G-білок трансдуцин, який активує фермент цГМФ-фосфодіестеразу. В результаті активації цього ферменту в клітці падає концентрація цГМФ і закриваються цГМФ-залежні натрієві канали. Оскільки іони натрію постійно видаляються з клітки АТФ-азою, концентрація іонів натрію всередині клітки

падає, що викликає її гіперполяризацію. В результаті фоторецептор виділяє менше гальмівного медіатора глутамату і в біполярній нервовій клітині, яка «розгальмовується», виникають нервові імпульси.

7.5. Кольоровий зір

Зоровий пігмент колб відрізняється від подібного для паличок. В якості хромофора, як і раніше, виступає 11-цис-ретиналь, а білкова частина має декілька іншу будову. Світлочутливий елемент колб називається **йодопсином**. При вимірюванні спектрів поглинання окремих колб виявилось, що кожна колба містить тільки один вид йодопсина, а типів колб всього три.

По чутливості до світла з різними довжинами хвиль розрізняють три види колб. Колби *S*-типу чутливі у фіолетово-синій (*S* від англ. *Short* – короткохвильовий спектр), *M*-типу – в зелено-жовтій (*M* від англ. *Medium* – середньохвильовий), і *L*-типу – в жовто-червоній (*L* від англ. *Long* – довгохвильовий) частинах спектру. Наявність цих трьох видів колб (і паличок, чутливих в зеленій частині спектру) дає людині кольоровий зір. Кожна колба містить тільки один вид цих молекул.

Довгохвильові і середньохвильові колби (з піками в жовто-червоному і синьо-зеленому діапазонах) мають широкі зони чутливості зі значним перекриванням, тому колби певного типу реагують не тільки на свій колір; вони лише реагують на нього інтенсивніше за інших.

Палички чутливі в зеленій частині спектру (максимум – 498 нм). У іншій частин спектру чутливі колби різних видів. Наявність паличок і різних видів колбочок дає людині кольоровий зір.

Комбінація отриманих сигналів передається в головний мозок, де аналізується. В результаті виникає відчуття того або іншого кольору.

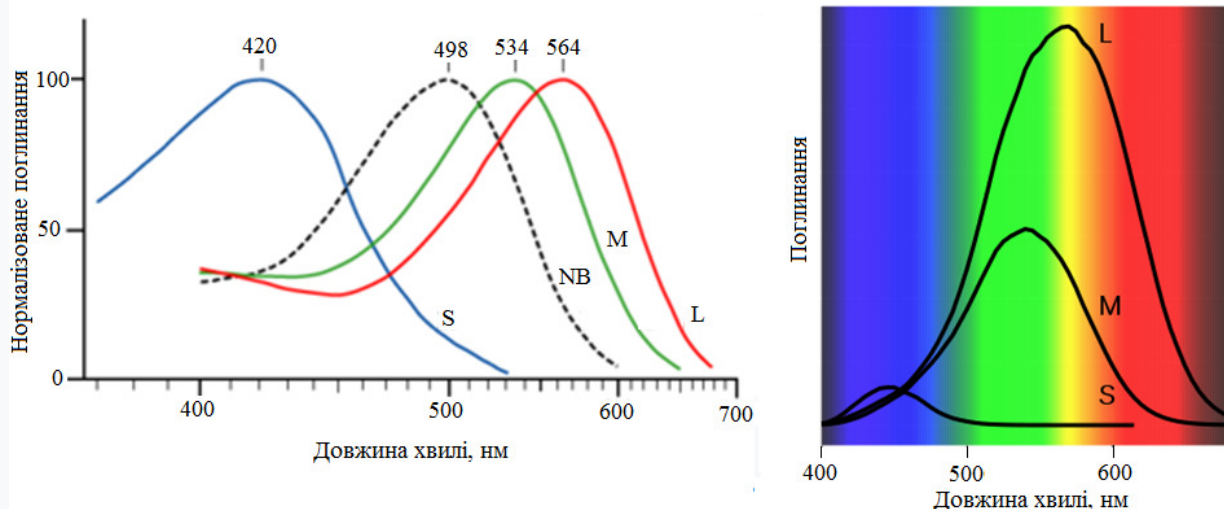


Рис. 7.8. Нормалізовані графіки чутливості людських клітин-колбочок різних видів (S, M, L) та клітин-паличок (NB) до різних частин спектру

У нічний час, коли потік фотонів недостатній для нормальної роботи колб, зір забезпечують тільки палички, тому вночі людина не може розрізняти кольору.

Колби приблизно в 100 разів менш чутливі до світла, чим палички (інший тип кліток сітківки), але набагато краще сприймають швидкі рухи.

Поглинання світла йодопсинами приводить до появи РРП в колбах. Для того, щоб виміряти спектр дії РРП, амплітуди РРП, що реєструють після коротких спалахів яскравого монохроматичного світла.

При деяких генетичних захворюваннях порушується синтез одного з білків йодопсинів, внаслідок чого не утворюється відповідний пігмент кольорового зору і людина втрачає здатність розрізняти кольори. Ця хвороба називається дальтонізмом.

У будові колби прийнято розрізняти (рис. 7.3b):

- зовнішній сегмент (містить мембранні напівдиски),
- зв'язуючий відділ (перетяжка),
- внутрішній сегмент (містить мітохондрії),
- синаптичну область.

Зовнішній сегмент заповнений мембранними напівдисками, утвореними плазматичною мембраною. Вони є складками плазматичної мембрани, покритими світлочутливим пігментом. Повернена до світла, зовнішня частина стовпчика з напівдисків, постійно оновлюється за рахунок фагоцитозу «засвічених» напівдисків клітинами пігментного епітелію і постійного утворення нових напівдисків в тілі фоторецептора. Так відбувається регенерація зорового пігменту. В середньому, за добу фагоцитується близько 80 напівдисків, а повне оновлення всіх напівдисків фоторецептора, відбувається приблизно за 10 днів. У колбах мембранних напівдисків менше, ніж дисків в паличці, і їх кількість близько декількох сотень. У районі зв'язуючого відділу (перетяжки), зовнішній сегмент майже повністю відокремлений від внутрішнього. Зв'язок між двома сегментами здійснюється через цитоплазму і пару вій.

7.6. Фотопошкодження очей

Рогівка і кришталик окрім того, що вони відповідальні за формування зображення на сітківці, виконують також роль граничних світлофільтрів, що пропускають випромінювання з довжинами хвиль більше 300 і 400 нм відповідно. В обох структурах при дуже великих дозах УФ випромінювання відбуваються фотохімічні пошкодження, що виражаються в помутнінні і запальних реакціях. У присутності сенсibilізаторів фотопошкодження очей різко посилюються. Фотопошкодження кришталика необернені.

У клітках сітківки здійснюються фотопошкодження під дією світла, поглиненого ретиналем. Ретиналь розтрачує енергію електронного збудження в процесах цис-транс і транс-цис (фоторегенерація родопсину) - ізомеризації. В інших фотохімічних реакціях пов'язаний з опсином ретиналь, мабуть, практично не бере участь. Проте не всі молекули родопсину після поглинання першого фотона встигають поглинути ще один фотон і фоторегенерувати. Частина молекул розпадається на опсин і повністю транс-ретиналь. Вільний ретиналь є на світлі ефективним **генератором синглетного кисню**. Квантовий вихід інтерконверсії вільного ретиналя високий (0.4–0.7). Максимуми спектрів поглинання різних ізомерів вільного ретиналя розташовуються ~360–380 нм, довгохвильовий хвіст захоплює фіолетову область видимого світла. Тому фіолетове світло викликає генерацію триплетних збуджених станів ретиналя, що у свою чергу приводить до значного окислювального пошкодження мембран дисків рецепторних кліток. Субстратом окислення є головним чином залишки поліненасиченої жирної кислоти. Ретиналь сенсibiliзує окислення компонентів мембран за рахунок генерації синглетного кисню (фотопошкодження мембран). Це дуже важливий негативний ефект, що лежить в основі опіку очей під дією видимого світла. Для захисту очей можна рекомендувати два способи: застосовувати антиоксиданти, а також користуватися світлозахисними окулярами, що не пропускають фіолетове і синє світло. Носіння синіх окулярів (проникних синє світло) дуже шкідливо для очей, оскільки ці окуляри, ослабляючи інтегральний світловий потік, стимулюють розширення зіниць. На сітківку в результаті потрапляє велика кількість фіолетового світла і сенсibiliзує-мий ретиналем опік посилюється.

Розділ 8. ФОТОРЕГУЛЯТОРНІ СИСТЕМИ

8.1. Фототаксис

Фототаксис відноситься до інформаційних фотобіологічних процесів. Під **фототаксисом** розуміють фотоіндуковані направлені рухи вільних біологічних об'єктів. Пристосовні рухові реакції високоорганізованих тварин, викликані світловими сигналами (наприклад, умовні і безумовні рефлексі на світло), можна було б також віднести до реакцій фототаксису.

Розрізняють топо- і фоботаксиси. **Топотаксис** – рух об'єкту до джерела світла (позитивний) або від нього (негативний). До топотаксису відноситься також **тропофототаксис**, при якому відбувається орієнтація об'єктів уподовж або упоперек променя (ефект повороту).

Фоботаксис – переміщення об'єктів, пов'язане не з напрямом світлового променя, а з освітленістю поля. Вихід об'єктів зі світлового поля розглядається як негативний, а зворотний перехід (темнота > світло) – як позитивний фоботаксис. При фоботаксисі клітка міняє напрям руху на зворотне на межі ділянок з різною освітленістю (шокова реакція, реакція «переляку»). Позитивний фоботаксис перешкоджає переходу в більш затінену ділянку, що приводить до скупчення безладно рухомих клітин в світловій плямі (ефект світлової пастки).

Явище фототаксису властиво найрізноманітнішим представникам тваринного і рослинного світу: простим, черв'якам, бактеріям, водоростям і ін. Фототаксис спостерігається також у внутрішньоклітинній організмі, наприклад у хлоропластів водоростей.

Фототаксис забезпечує вибір оптимальних умов освітлення для фотосинтезу і життєдіяльності кліток і може розглядатися як важлива пристосовна реакція мікроорганізмів. При високих інтенсивностях світла характер фототаксису водорості змінюється – позитивний таксис стає негативним. Тип негативного фототаксису (топо- або фоботаксиса) визначається головним чином особливостями організму.

Механізм фототаксису включає три основні стадії: поглинання світла і первинна реакція у фоторецепторі; перетворення стимулу і передача сигналу руховому апарату; зміна руху джгутиків. По механізму реакцій розрізняють неспеціалізований і спеціалізований фототаксис. При неспеціалізованому **фототаксисі**, характерному для фотосинтезуючих бактерій і ряду водоростей, фоторецептором служить фотосинтетичний апарат, що заключний в хлоропластах і хроматофорах, а появу сигналу пов'язують зі зміною швидкості первинних процесів фотосинтезу (потіку електронів, фотофосфорілювання) при зміні інтенсивності світла, обумовленій переміщенням організму. **Спеціалізований фототаксис** забезпечується спеціальним апаратом. У евглени (рис. 8.1) він

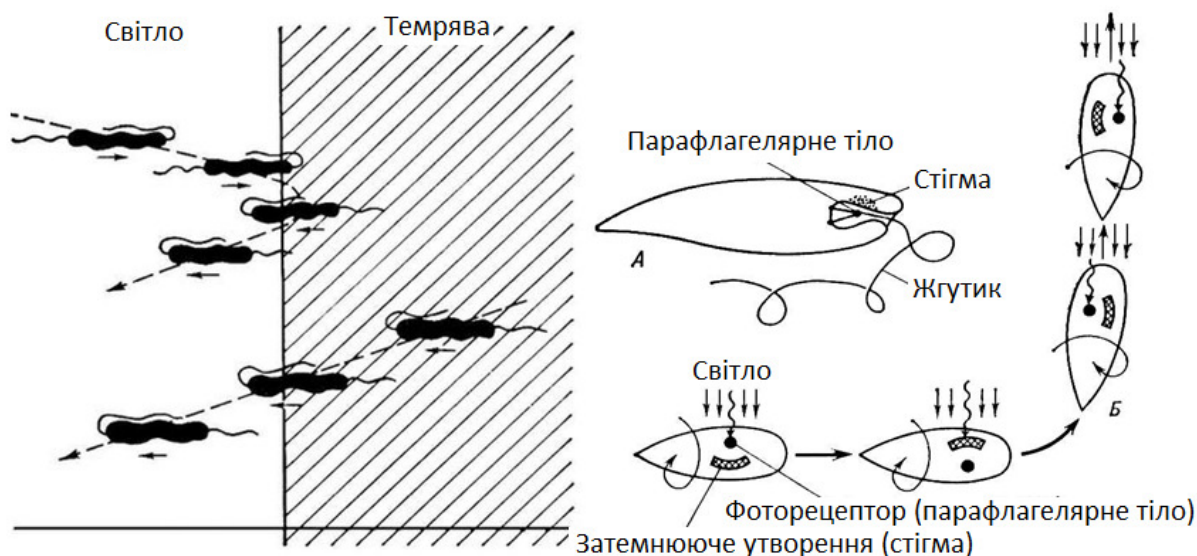


Рис. 8.1. Фототаксис

складається з парафлагеллярного тіла, просторово пов'язаного з джгутиком, і розташованої збоку забарвленої стигми. При русі (як у темряві, так і на світлі) клітка обертається навколо подовжньої осі. Тому при бічному освітленні стигма періодично затінює парафлагеллярне тіло, яке, як вважають, служить фоторецептором, що і приводить до виникнення сигналу, що викликає зміну напрямку руху. Механізм виникнення сигналу у фоторецепторі, мабуть, пов'язаний з генерацією електричного потенціалу. Стимул діє до тих пір, поки клітина не повертається паралельно напрямку світлового потоку – положення, в якому фоторецептор не затемнюється. Описаний пристрій (об'ємом в декілька мкм) з високою точністю направляє клітину на джерело світла або від нього і служить прикладом біологічної мікросистеми з автоматичним регулюванням.

8.2. Фотокінез

Близьке до фототаксису явище фотокінезу полягає в збільшенні або зменшенні під дією світла рухливості біологічних об'єктів (відповідно, позитивний і негативний кінези).

Проте в протилежність таксису кінез не супроводжується направленим рухом по відношенню до джерела світла.

Вивчення спектру дії фотокінезу показує, що в ролі акцепторів світла у різних організмів можуть виступати такі пігменти, як хлорофіл *a* у *Cyanophyceae*, фікоціанін у *Phormidium autumnale*, хлорофіл *a* і каротиноїди у *Euglena* (рис. 8.2).

У спектрі дії кінезу евглени виявля-

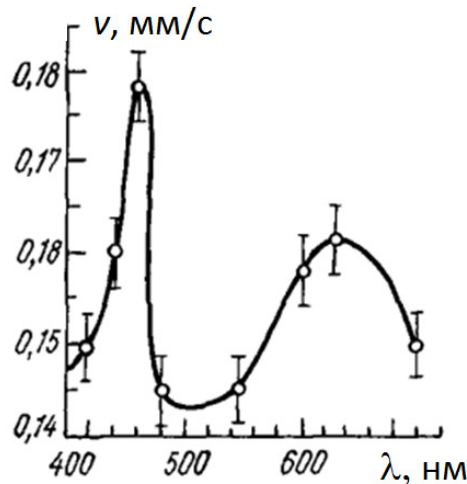


Рис. 8.2. Спектр дії збільшення рухливості евглени

ються два виражені максимуми: короткохвильовий 460 нм і довгохвильовий 640 нм. Перший з них приписується каротиноїдам, другий – хлорофілу *a*.

8.3. Фототропізм

Фототропізм – індукований світлом рух частини фіксованого біологічного об'єкту. Розрізняють позитивний (рух до джерела світла) і негативний (від джерела) фототропізм. Фототропізм спостерігається у найрізноманітніших представників рослинного миру: вищих і нижчих рослин, зокрема грибів і закріплених на ґрунті водоростей.

Реакції фототропів у вищих рослин, як правило, характеризуються складною залежністю від інтенсивності видимого світла.

Процес росту складається з трьох етапів – ділення клітин, збільшення їх розмірів і диференціювання (спеціалізації). Цей процес протікає не у всіх частинах рослини. Це, отже, відбиватиметься на дії і розподілі різних ростових речовин в рослині.

Ауксин (від греч. *auxein* – збільшувати) – індолілуксусна кислота. Вона широко поширена в рослинному царстві і що з нею тісно пов'язане збільшення розмірів рослинних кліток.

Ауксин не інактивується під дією світла, а рухається від його джерела. В результаті на тіньовій стороні його концентрація зростає, що стимулює розтягування кліток в цій області, і рослина згинається.

Отже, світло реалізує свою тропну дію через створення бічного градієнта ауксинів, який обумовлений швидше за все зміною проникності клітинних мембран. Ефект достатньо сильний, що приводить до того, що один квант світла здатний «перемістити» більше 100 молекул ауксину.

Ауксини безперервно утворюються в верхівці (апексе) втечі і молодого листа. Рух їх від місця синтезу походить базипетально (від вершини до підстави органу) і полярно (тільки у одному напрямі). Мабуть, вони рухаються від клітки до клітки шляхом дифузії і зрештою інактиву-

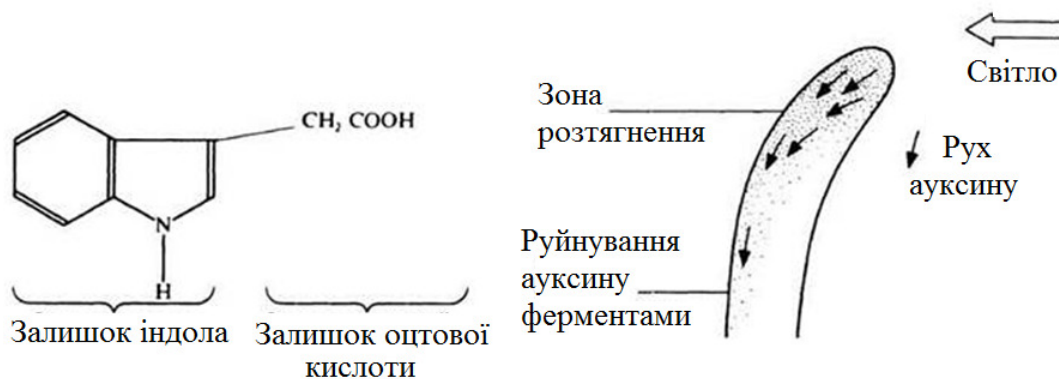


Рис.8.3. Ауксин и його рух при дії світла

ються і руйнуються ферментами. Транспорт на дальні відстані здійснюється по провідній системі (в основному по флоемі) і направлений з пагону до коріння. Невелика кількість ауксинів, ймовірно, синтезується самим корінням.

8.4. Фотоморфогенез

Світло надає значний регуляторний вплив на зростання і розвиток рослин і мікроорганізмів. Такі реакції називаються **морфогенетичними**. В багатьох рослин є фоторегуляторна система, дія якої розповсюджується на дуже багато фізіологічних процесів: індукція проростання насіння, синтез ряду ферментів, зростання рослин розтягуванням, розвиток листових зачатків, утворення хлорофілу, синтез рибосомальної РНК, індукція цвітіння та ін.

Прояв фітохромної регуляторної системи полягає в тому, що світлозалежні процеси в рослинах індуються світлом з довжиною хвилі 660 нм, але припиняються при дії світла з довжиною хвилі 730 нм (якщо проміжок часу між імпульсами не перевищує певної величини – **часу втікання**).

Час втікання залежить від того, наскільки швидко після дії червоного світла, активізуючого фітохромну систему, настає фізіологічна реакція. Наприклад, настання цвітіння як реакція на дію червоного світла настає через тиждень після активації фітохромної системи. Проростання світлочутливого насіння спостерігається опісля декілька годин або днів після активації фітохромної системи, а зміна трансмембранних потенціалів у клітин коріння – протягом декількох секунд.

У відповідь реакція рослин у всіх випадках визначається тим, яка дія була останньою. Фітохромна система діє як низькоенергетична система, що означає необхідність поглинання зовсім малих кількостей енергії для прояву реакції.

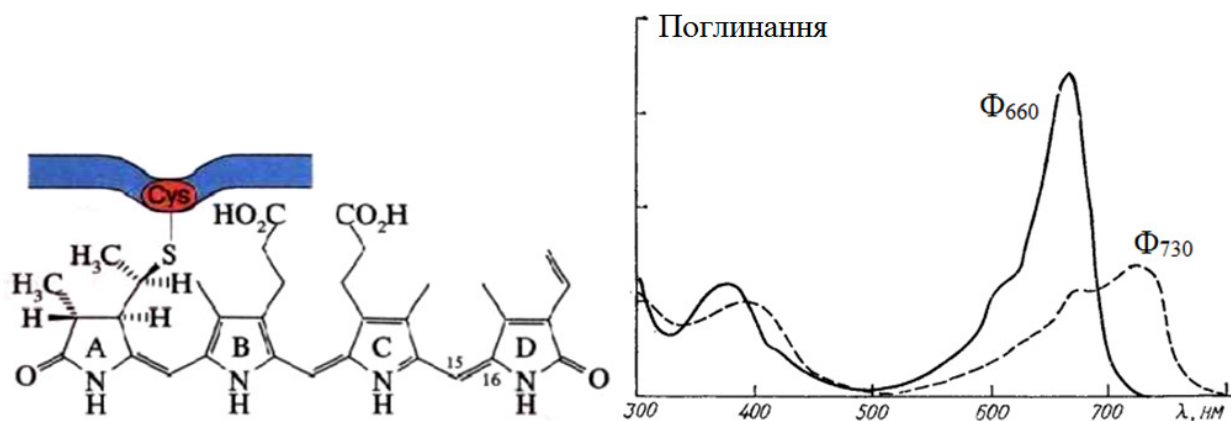


Рис. 8.4. Фітохром та його спектр поглинання

Фітохром виділений з багатьох рослинних об'єктів. Фітохром міститься у всіх органах рослини в нікчемних кількостях, тому, хоча він і забарвлений, він не видно, проте в зростаючих верхівках пагонів його концентрація підвищена. Він є хромопротеїном синьо-зеленого світла, що існує у вигляді двох взаємообернених форм: Φ_{660} і Φ_{730} , що поглинають світло 660 і 730 нм. Хромофорна група його – лінійний тетрапірол, який пов'язаний з поліпептидним ланцюгом через кисень і сірку.

У звичайному сонячному світлі переважають червоні промені, їх більше, ніж дальніх червоних, тому вдень в рослинах переважає форма Φ_{730} . Це фізіологічно активна форма, яка в темряві (вночі) поволі перетворюється на стабільнішу, але неактивну форму Φ_{660} .

При поглинанні світла фітохром відбувається його Z-E ізомеризація, в чому і виражається фотооборотність змін форм цього пігменту.

У ряду вищих рослин, грибів, водоростей і мікроорганізмів фоторегуляція обумовлена сприйняттям синього кольору **криптохромами**. Спектр дії фізіологічних реакцій на синій колір характеризуючись наявністю максимумів в області 370 і 450 нм. Поглинання світла криптохромами уповільнює зростання гіпокотилу або міжвузлів, допомагає контролювати деетиоляцію рослин і визначати тривалість дня.

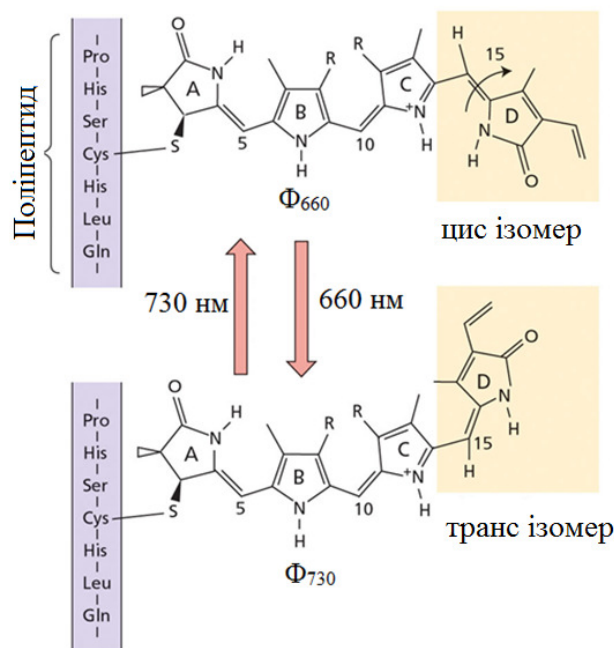


Рис. 8.4. Фотоперетворення фітохрому

8.5 Фотоперіодизм

Один з важливих шляхів дії світла на живі організми пов'язаний зі сприйняттям змін довжини світлового дня, або фотоперіоду. Чим далі від екватора, де довжина світлового дня завжди складає приблизно 12 ч, тим більше її сезонні коливання. В помірних широтах довгота дня протягом року варіює від 9 до 15 год., тому абсолютно очевидно, що вона служить одним з важливих сигналів до сезонної перебудови життєдіяльності.

Добре відомо, що у рослин такі етапи їх життєвого циклу, як цвітіння, плодоношення, проростання, поява і опадання листя і тому подібне чітко узгоджуються з закономірними змінами протягом року довготи дня і температури, причому порушення по яких-небудь причинах такої

адаптивної кореляції приводить до загибелі рослин.

Найбільш глибокі зміни у рослин відбуваються під час цвітіння, коли меристеми (твірні тканини рослин) пагонів замість листя і бічних бруньок починають формувати квітки. Значення фотоперіоду для зацвітання рослини було відкрито ще в 1910 р. Гарнером і Аллардом в 1920 г показано, що рослини тютюну зацвітають тільки після витримки їх протягом деякого часу в умовах короткого світлового дня. В природі такі умови виникають восени, але їх можна створити і влітку в теплиці, підтримуючи там освітлення протягом 7 ч в добу. Відповідно до цього тютюн назвали короткоденною рослиною (КДР), або рослиною короткого дня. При вивченні інших видів було виявлено, що деяким для цвітіння потрібний довгий день; це – довгоденні рослини (ДДР), або рослини довгого дня. Існують рослини, які квітнуть незалежно від довготи дня; їх називають нейтральними. Така залежність фізіологічного (фенологічного) стану від тривалості світлого часу доби називається **фотоперіодизмом**.

Фотоперіодизм залежить від температури. Деякі рослини при одній температурі поведуться як нейтральні, а при іншій – ні.

Насправді, важлива не довжина світлого, а темного періоду доби. Таким чином, короткоденні рослини насправді виявляються «довгонічними». Якщо вирощувати ці рослини в умовах короткого дня, перериваючи довгу ніч невеликим світлим періодом, то цвітіння не дочекається. Навпаки, довгоденний вигляд в таких умовах зацвіте. Разом з тим ефект довгого дня не знімається перериванням короткої нічної темноти.

В кінці світлового періоду фітохром знаходиться в біологічно активній формі Φ_{730} . До кінця короткої ночі його повільне перетворення на неактивну форму Φ_{660} може і не завершитися. Отже, логічно допустити, що у ДДР Φ_{730} стимулює цвітіння, а у КДР – пригнічує. У цих останніх цвітіння можливе тільки після достатньо довгих ночей, протягом яких рівень Φ_{730} опуститься до порогової відмітки. На жаль, коротка дія дальнього червоного світла, теоретично еквівалентна довгій ночі, не завжди відтворює її ефект, так що ситуація в даному випадку складніша. До того ж якоюсь мірою важливий і сам чинник часу.

Розділ 9. ВИПРОМІНЮВАННЯ РАДІОЧАСТОТНОГО ДІАПАЗОНУ

9.1. УВЧ і СВЧ випромінювання

Природними джерелами хвиль радіочастотного діапазону є Сонце (1360 Вт/м^2), планети і інші космічні об'єкти. В радіозв'язку, промисловості, медицині широко використовуються штучні джерела радіовипромінювання.

Зі всього радіохвильового спектру виділяють дециметровий або ультрачастотний (УВЧ) діапазон ($\lambda = 0.1 - 1 \text{ м}$); сантиметровий або надвисокочастотний (СВЧ) діапазон ($\lambda = 0.01 - 0.1 \text{ м}$), які надають найбільш вираженою дією на живі організми.

Дозиметрія мікрохвильового опромінювання досить складна, оскільки жива тканина негомогенна, від меж розділу (наприклад, шкіра – жирова тканина, жирова тканина – м'язова тканина) походить віддзеркалення випромінювання, що може привести до виникнення стоячих хвиль в середовищі.

Електромагнітне опромінювання, особливо в СВЧ-діапазоні, підвищує температуру тканини на деяку величину ΔT , причому ΔT прямо пропорційна поглиненій потужності P .

Енергія мікрохвильового випромінювання недостатня для виникнення електронно-збуджених станів. Тому дія мікрохвильового випромінювання на живі організми викликає теплові і нетеплові ефекти. Тепловий ефект електромагнітного поля визначається його дією як на іони, так і на нейтральні частинки. У першому випадку змінні поля викликають змінні струми провідності в тканинах, що супроводжується виділенням джоулевого тепла. У другому випадку електричне поле викликає поляризацію нейтральних молекул і виникнення струмів зсуву. Коливання частинок в змінному полі супроводжуються тертям і виділенням теплової енергії. Зі зменшенням частоти зовнішнього поля зменшується частота коливань частинок і теплові втрати стають менше. З іншого боку, при збільшенні частоти електрони (у разі деформаційної поляризації) або молекули (у разі орієнтаційної поляризації) можуть не встигати змінювати своє положення в просторі, що також знижує теплові втрати. Отже, при якомусь значенні частоти коливань тепловий ефект буде максимальним (резонанс поглинання). Це спостерігається у разі збігу частоти зовнішнього поля з власною частотою коливань частинки. Наприклад, у разі орієнтаційної поляризації молекул води максимум поглинання знаходиться на частоті 10^{10} Гц (у СВЧ-діапазоні). Орієнтаційна поляризація молекул води вносить основний внесок до поглинання електромагнітного випромінювання живими організмами. Тому тканини, в яких зміст води великий, нагріваються сильніше (наприклад, м'язи і

кров) в порівнянні з тими, де зміст води менший (кісткова і жирова тканина).

У гомогенному просторі потужність випромінювання убиває з відстанню по експоненціальному закону $P = P_0 e^{-\alpha x}$, де α – коефіцієнт загасання. Обернена величина $d = 1/\alpha$ називають глибиною його проникнення в тканині, тобто відстань, на якій потужність падаючої енергії зменшується в e разів.

Зі збільшенням частоти випромінювання і діелектричної проникності тканини глибина проникнення зменшується. Чим більше вміст води в тканині, тим менше d . Наприклад, глибина проникнення УВЧ хвиль в м'язовій тканині і шкірі складає близько 4 см, а в жировій і кістковій тканині – близько 20 см. Для СВЧ хвиль, відповідно, 2 і 10 см. Діелектрична проникність і провідність біологічних тканин залежать від частоти падаючого випромінювання і визначаються вмістом в тканині води, іонів, дипольних молекул.

Нагріваючи тканини традиційними способами і нагріваючи, викликаний дією СВЧ випромінювання, істотно відрізняються. У першому випадку відбувається нагрів поверхневого шару, і проникнення тепла в глибші шари залежить від теплопровідності тканини, тоді як УВЧ- і СВЧ випромінювання викликає **нагрівання за всім обсягом** опромінюваного об'єкту. Зі зменшенням довжини хвилі зменшується глибина проникнення випромінювання в тканину, що викликає нагрів лише поверхневих шарів. Об'ємний тепловий ефект СВЧ, а також УВЧ випромінювання широко використовується в медицині. Нагріваючи, викликаний УВЧ і СВЧ випромінюванням, неоднорідний унаслідок неоднорідності самого організму. У деяких місцях можуть з'являтися локальні перегріви. Причиною цього явища може бути виникнення стоячих хвиль в середовищі. Іноді місцевий перегрів може компенсуватися механізмами тепловіддачі. Наприклад, поглинання випромінювання мембранами відбувається в 4 рази більш інтенсивніше, ніж навколишніми тканинами, проте поглинена енергія майже відразу ж розсівається в навколишню мембрану середовище. Найбільш чутливими органами є ті, які мають хорошу теплоізоляцію і/або недостатнє кровопостачання (внутрішні органи, кришталік і склоподібне тіло ока). Пухлини набагато гірше забезпечуються кров'ю, чим тканини, що оточують їх, що уповільнює розсіювання тепла. Тому при СВЧ випромінюванням пухлина нагрівається більшою мірою, чим здорові тканини. На цьому засновано лікування онкологічних захворювань СВЧ-нагрівом.

Тривале СВЧ випромінюванням викликає гіпоксію (понижений вміст кисню в тканинах), зниження працездатності, підвищення стомлюваності організму, а також ряд інших порушень, особливо в нервовій і серцево-судинній системах.

9.2. КВЧ-випромінювання

Крайнє високочастотне випромінювання (КВЧ) – електромагнітне випромінювання з довжиною хвиль від 1 до 10 мм. Для лікувальної дії в КВЧ-терапії використовується електромагнітне випромінювання інтенсивністю менше 10 мВт/см².

Вивчення ефектів нетеплової дії електромагнітного випромінювання КВЧ-діапазону почалося в 1960 роках. Було показано, що живі організми самі можуть випромінювати хвилі в мм-діапазоні, використовуючи це випромінювання в цілях управління міжклітинними взаємозв'язками.

Електромагнітні хвилі КВЧ мають вкрай малу проникаючу здатність. Вони сильно поглинаються у воді і водних середовищах. Для медико-біологічних застосувань цей факт є істотним, оскільки при проникненні в шкіру людини на глибину близько 0.3...0.5 мм вони затухають більш ніж в мільйон разів. Енергія його квантів нижча за енергію хімічних зв'язків, тому випромінювання КВЧ не пошкоджує молекули і, тим більше, атоми, не є іонізуючим. Нагрів тканин випромінюванням КВЧ незначний, теплову дію на організм воно не надає.

Тому дію КВЧ випромінювання прийнято розглядати як специфічну біоінформаційну функцію електромагнітних хвиль, пов'язану з резонансним поглинанням енергії, запуском автоколивальних процесів і конформаційною перебудовою в біологічних структурах.

Одним з методів лікування ішемічної хвороби серця також може бути КВЧ-терапія: в результаті можна істотно понизити кількість антиангінальних препаратів, що приймаються, а також ризик розвитку інфаркту міокарду хворих нестабільною стенокардією. міліметрові хвилі знижують функціональну активність тромбоцитів і коагуляційний потенціал, підвищують рівень фізіологічної здібності крові до спонтанного розчинення тромбів. Такий вплив змінює мікроциркуляцію і підвищує міокардіальні резерви кровообігу.

КВЧ випромінювання надає протизапальна і протинабрякла дія, сприяючи відтоку рідини, що скупчилася, при запальних захворюваннях суглобів і навколосуглобових тканин при артритах і бурситах. Одночасно КВЧ-терапія позитивно впливає на роботу центральної нервової системи і нейро-ендокринну регуляцію, сприяє поліпшенню гормонального статусу організму, надає імунomodуючу дію, підвищуючи захисні сили організму і стимулюючи процеси відновлення (регенерації) тканин.

Самим значущим ефектом дії мм-хвиль є підвищення стійкості організму до дії зовнішніх і внутрішніх несприятливих чинників за рахунок мобілізації його власних резервів, що дозволяє використовувати КВЧ-терапію і в профілактичних цілях.

9.3. Терагерцове випромінювання

Терагерцове випромінювання (ТГц) – вид електромагнітного випромінювання, спектр частот якого розташований між інфрачервоним і мікрохвильовим діапазонами. Межі між цими видами випромінювання в різних джерелах визначаються по-різному. Максимальний допустимий діапазон довжин хвиль 1 – 0.1 мм. Такі хвилі ще називаються субміліметровими. ТГц випромінювання – не іонізуюче, легко проходить крізь більшість діелектриків, але сильно поглинається провідними матеріалами і деякими діелектриками. Наприклад, дерево, пластик, кераміка для нього прозорі, а метал і вода – ні.

Як ТГц джерел з недавнього часу використовуються лінійні прискорювачі і синхротрони. Випромінювання вищеперелічених джерел є гальмівним, воно виходить від електронів, прискорено рухомих в електричному або магнітному полі спеціальної конфігурації у вакуумній камері. Випромінювання вищеперелічених джерел є гальмівним, воно виходить від електронів, прискорено рухомих в електричному або магнітному полі спеціальної конфігурації у вакуумній камері.

У системах безпеки використовується ТГц (мм) випромінювання для сканування багажу і людей. На відміну від рентгенівського, ТГц випромінювання не наносить шкоди організму. За його допомогою можна розгледіти заховані під одягом людини металеві, керамічні, пластикові і інші предмети на відстанях до десятків метрів.

В медичній практиці починають упроваджуватися ТГц томографи, за допомогою яких можна досліджувати верхні шари тіла – шкіру, судини, м'язи – до глибини в декілька см. Це потрібно, наприклад, для отримання зображення пухлин.

У останнє десятиліття йде активний розвиток терагерцових технологій, проте до цих пір немає повної упевненості в безпеці цього випромінювання, тому вчені продовжують досліджувати дію субміліметрових радіохвиль на біологічні об'єкти.

Список використаної літератури

1. *Владимиров Ю. А., Потапенко А. Я.* Физико-химические основы фотобиологических процессов. М. Дрофа, 2006. – 285 с.
2. *Ахманов С. А., Никитин С. Ю.* Физическая оптика. Изд-во МГУ, Наука, Москва, 2004. – 656 с.
3. *Левшин Л. В., Салецкий А. М.* Люминесценция и ее измерения. М. Изд-во МГУ, 1989. – 272 с.
4. *Левшин Л. В., Салецкий А. М.* Оптические методы исследования молекулярных систем. М. Изд-во МГУ, 1994. – 320 с.
5. *Агранович В. М., Галанин М. Д.* Перенос энергии электронного возбуждения в конденсированных средах. М. Наука, 1978. – 383 с.
6. Фотобиофизика. Версия 1.0 [Электронный ресурс] : электрон. учеб. пособие / *И. Е. Суковатая, В. А. Кратасюк, В. В. Межевикин* и др. – Электрон. дан. (9 Мб). – Красноярск : ИПК СФУ, 2008.
7. *Конев С. В., Волотовский И. Д.* Фотобиология. – Минск, Из-во БГУ, 1979. – 385 с.
8. *Тиманюк В. А., Животова Е. Н.* Биофизика: Учебник для студ. вузов. – Х.: Изд-во НФАУ; Золотые страницы, 2003. – 704 с.
9. *Мельников М. Я., Иванов В. Л.* Экспериментальные методы химической кинетики. Фотохимия. Учебное пособие. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 2004. – 125 с.
10. *Мусієнко М. М.* Фотосинтез: навч. посібник для студ. вузів. – К. : Вища шк., 1995. – 247 с.
11. *Волькенштейн М. В.* Биофизика: учеб. руководство. – М. : Наука, гл. ред. физ.-мат. лит., 1988. – 592 с.
12. Биофизика: учеб. для студ. высш. учеб. заведений / Под ред. проф. *В. Ф. Антонова*. – М., Гуманит. изд. центр ВЛАДОС, 2003. – 288 с.
13. Ультрафиолетовое излучение. Влияние ультрафиолетового излучения на организм человека / *Е. В. Ненахова, Л. А. Николаева*. – Иркутск: ИГМУ, 2020. – 58 с.
14. *Костюк П. Г.* и др. Биофизика. Учебник для ВУЗов. Изд: "Высшая школа", 1988. – 504 с.
15. *Тучин В. В.* Лазеры и волоконная оптика в биомедицинских исследованиях. 2-ое изд. – Москва: Физматлит, 2010. – 478 с.
16. *Самойлов В. О.* Медицинская биофизика: учебник. – Спб.: СпецЛит, 2004. – 496 с.
17. *Девятков Н. Д., Голант М. Б., Бецкий О. В.* Миллиметровые волны и их роль в процессах жизнедеятельности. – М.: Радио и связь, 1991. – 168 с: ил.
18. *Костенко И., Устименко А.* Физиология растений: фотосинтез, хлорофилл, хлоропласты и производительность растений // [Электронный ресурс]. Посилання: <https://siriusap.com/articles/51-fiziologija-rastenii-fotosintez-hlorofill-hloroplasty-i-proizvoditelnost-rastenii.html> Дата публікації: 09.04.2017
19. Биология. Том 2 - руководство по общей биологии - 2004 // [Электронный ресурс]. Посилання: https://lifelib.info/biology/science_1/161.html.

Навчальне видання

Черненко Олександр Сергійович

**БІОФІЗИКА НЕІОНІЗУЮЧИХ
ВИПРОМІНЮВАНЬ**

КУРС ЛЕКЦІЙ

В авторській редакції

Підп. до друку 08.12.2022. Формат 60x84/16.
Ум.-друк. арк. 6,99. Наклад 15 пр.
Зам. № 2537.

Видавець і виготовлювач
Одеський національний університет імені І. І. Мечникова
Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 4215 від 22.11.2011 р.
65082, м. Одеса, вул. Єлісаветинська, 12, Україна
Тел.: (048) 723 28 39, e-mail: druk@onu.edu.ua