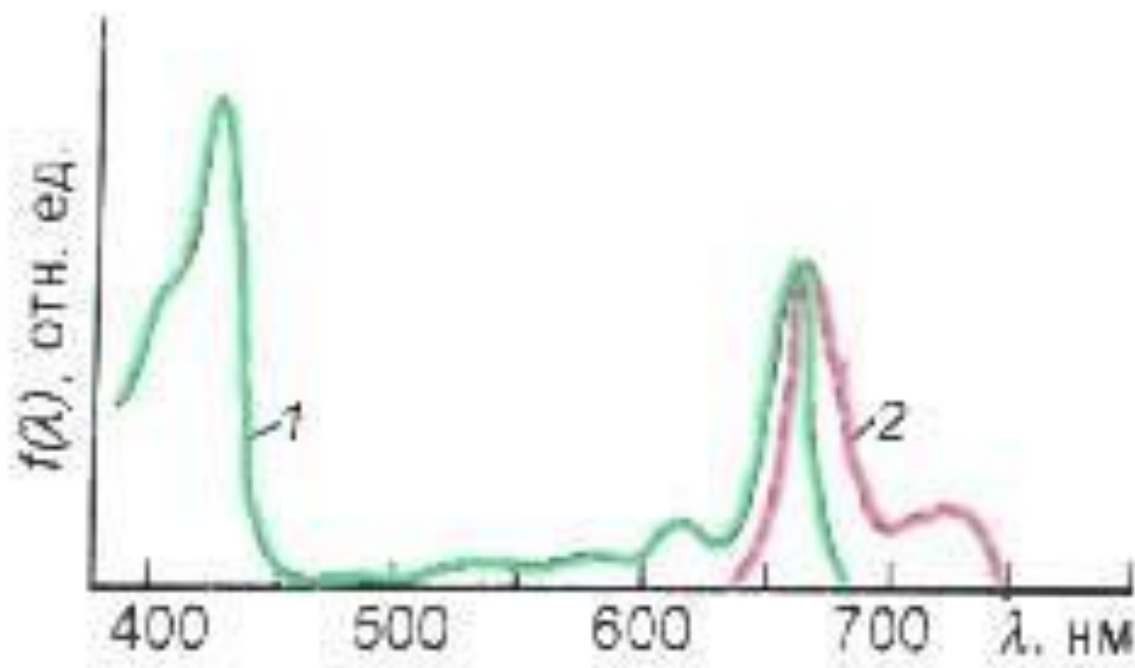


ЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ: ХАРАКТЕРИСТИКИ И ЗАКОНЫ



ХАРАКТЕРИСТИКИ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ

Спектр флуоресценции – зависимость интенсивности флуоресценции от длины волны испускаемого света



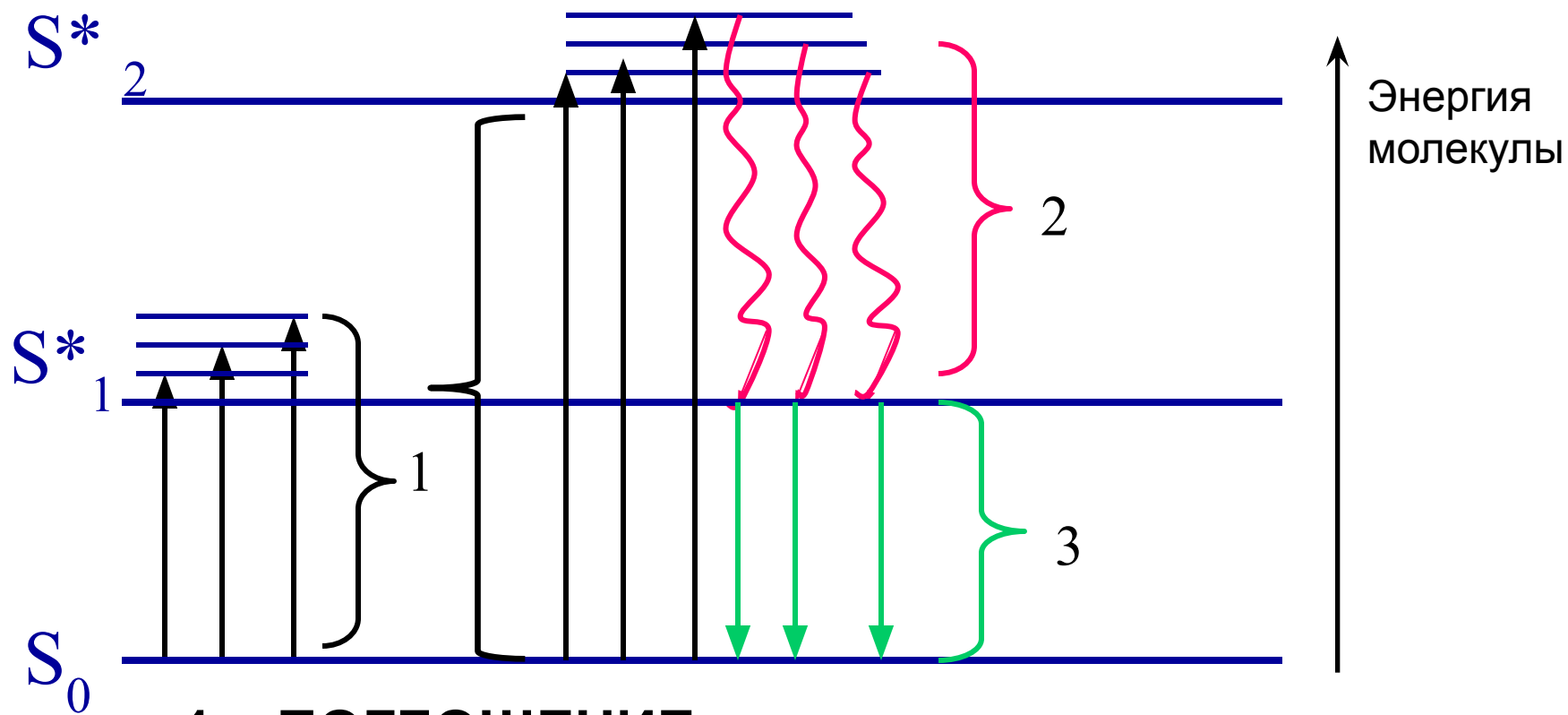
1 – спектр поглощения; 2 – спектр флуоресценции

Спектр возбуждения флуоресценции – зависимость интенсивности флуоресценции от длины волны возбуждающего света.

Квантовый выход флуоресценции – отношение количества испускаемых квантов к количеству поглощенных.

При возбуждении молекул линейно поляризованным светом наблюдается частичная поляризация флуоресценции. В этом случае измеряют ***степень поляризации флуоресценции***.

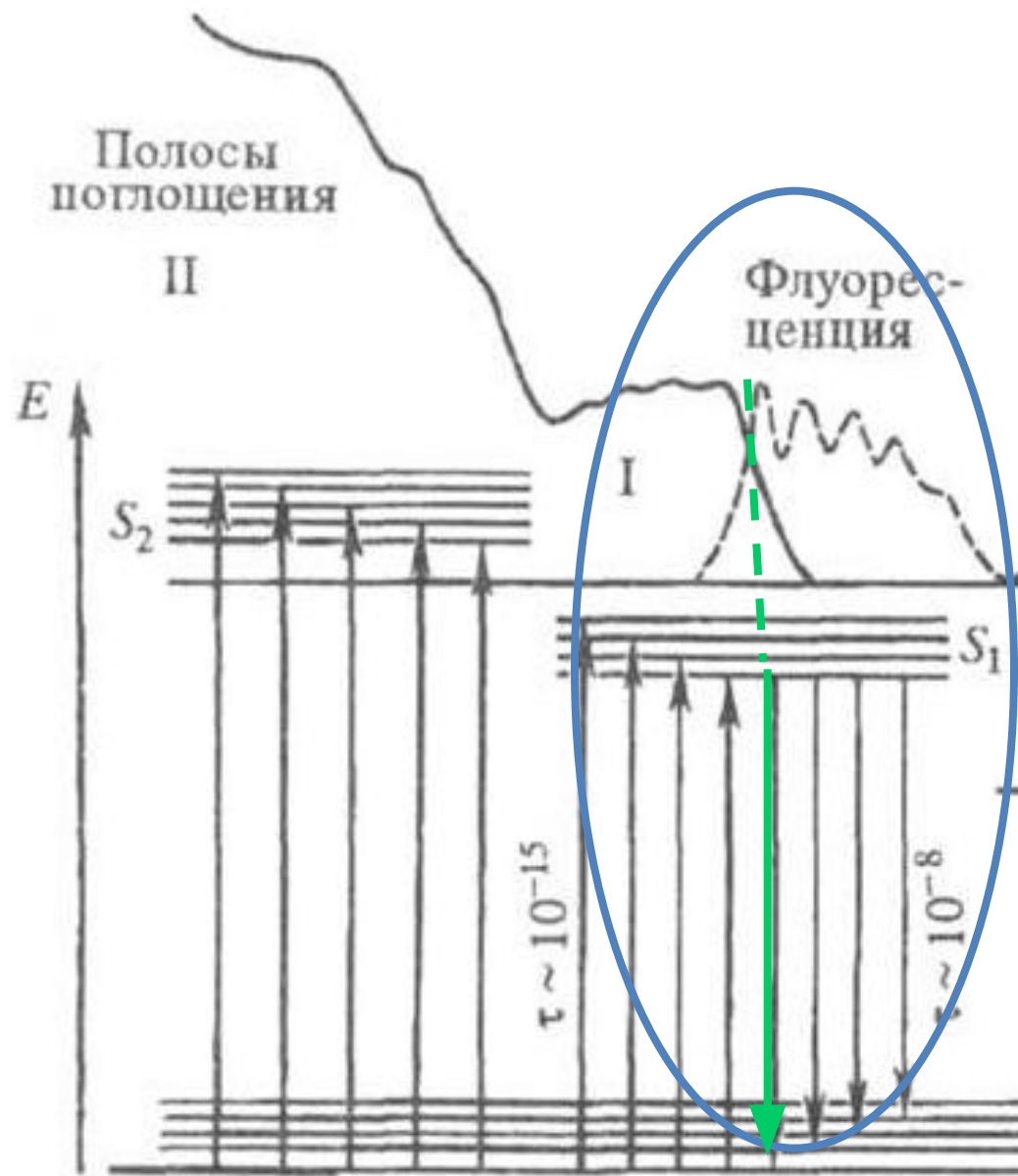
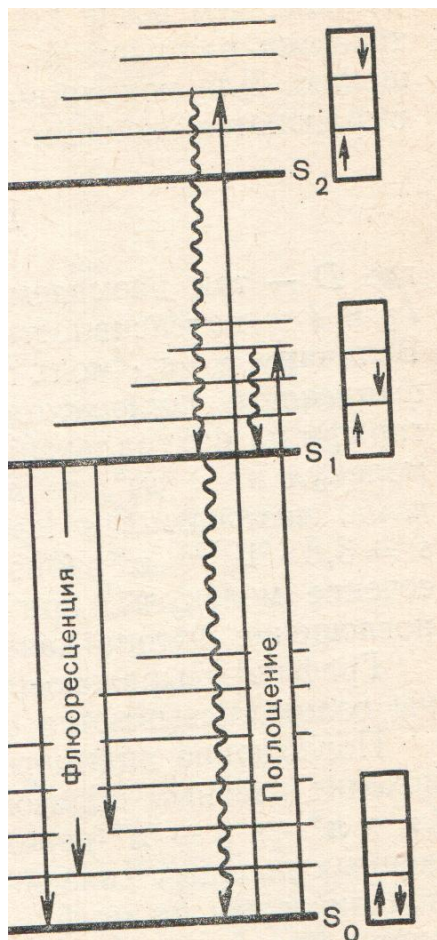
ЭЛЕКТРОННЫЕ ПЕРЕХОДЫ ПРИ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ



1 – ПОГЛОЩЕНИЕ

2 – **ВНУТРЕННЯЯ КОНВЕРСИЯ** (время 10^{-13} с)

3 – **ФЛУОРЕСЦЕНЦИЯ** (время 10^{-9} - 10^{-8} с)



ЗАКОНЫ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ

ЗАКОН СТОКСА

ПРАВИЛО ЛЕВШИНА

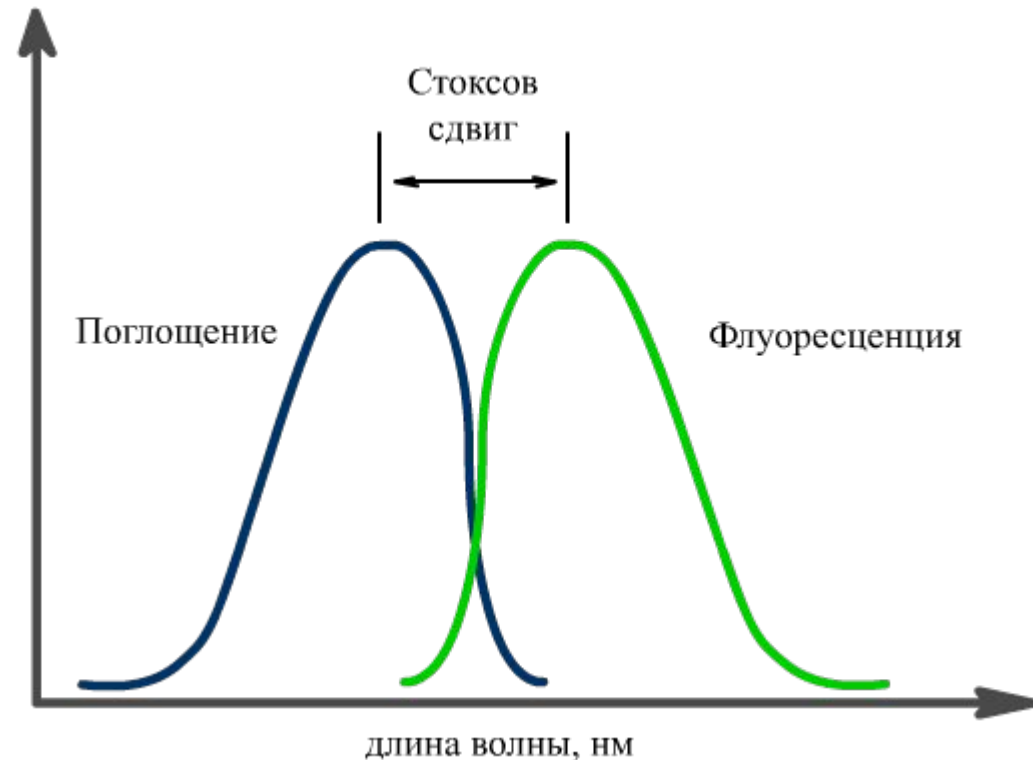
ПРАВИЛО КАША

ЗАКОН ВАВИЛОВА



Сэр Джорж Габриэль **СТОКС**
1819 - 1903

ЗАКОН СТОКСА: СПЕКТР
ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ СДВИНУТ В
ДЛИННОВОЛНОВУЮ ОБЛАСТЬ
ОТНОСИТЕЛЬНО СПЕКТРА
ПОГЛОЩЕНИЯ

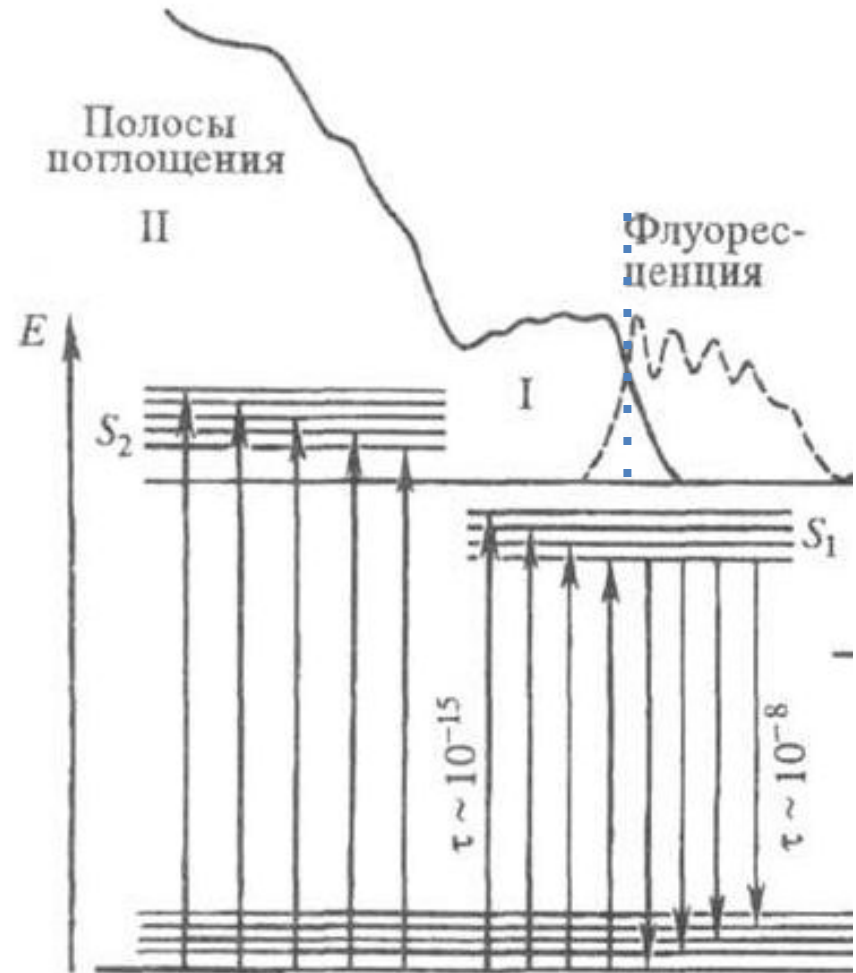




ПРАВИЛО ЛЕВШИНА: СПЕКТР ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ СИММЕТРИЧЕН ДЛИННОВОЛНОВОЙ ОБЛАСТИ СПЕКТРА ПОГЛОЩЕНИЯ

В.Л.Левшин

(1896 -1969)



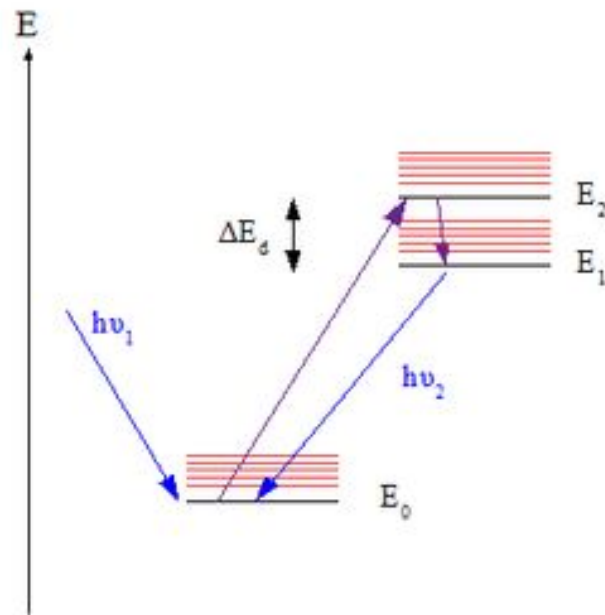


ПРАВИЛО КАША

Предложено химиком **Майклом Каша** (Michael Kasha) в 1950.

Майкл КАША
р.1920

Правило Каша: при облучении молекула будет излучать только за счет **низшего** по энергии возбужденного состояния.





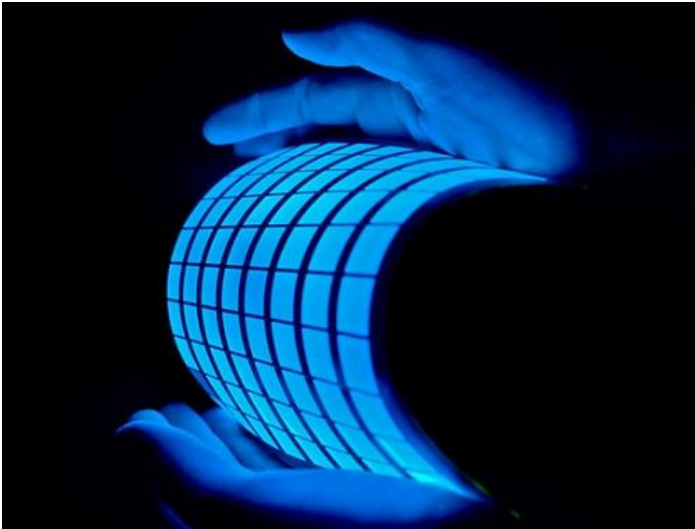
С.И.Вавилов

ПРАВИЛО ВАВИЛОВА: НЕЗАВИСИМОСТЬ
КВАНТОВОГО ВЫХОДА Φ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ОТ
ДЛИНЫ ВОЛНЫ ВОЗБУЖДАЮЩЕГО СВЕТА

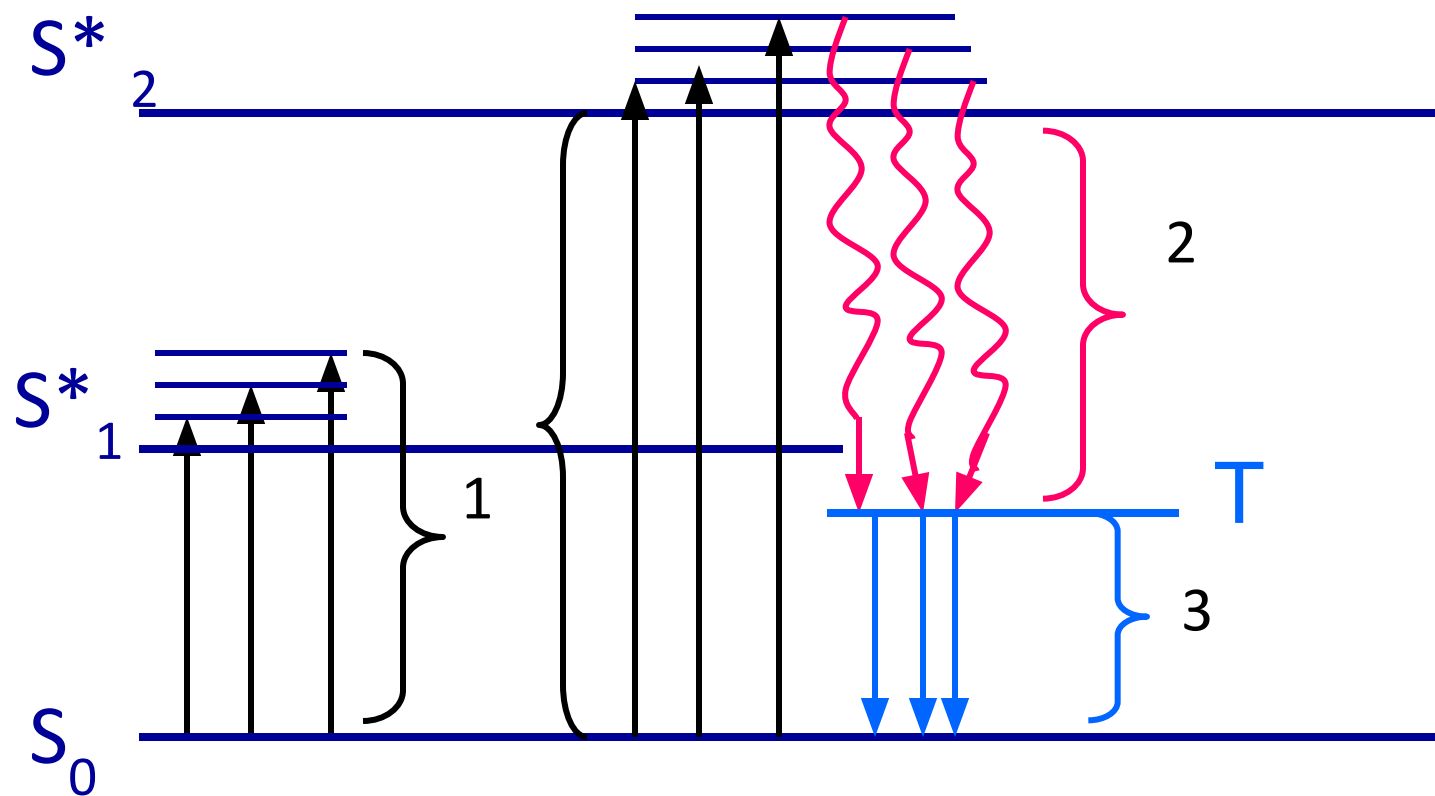
$$\Phi = \frac{n_{\text{исп}}}{n_{\text{погл}}}$$



ФЛОУОРЕСЦЕНЦИЯ



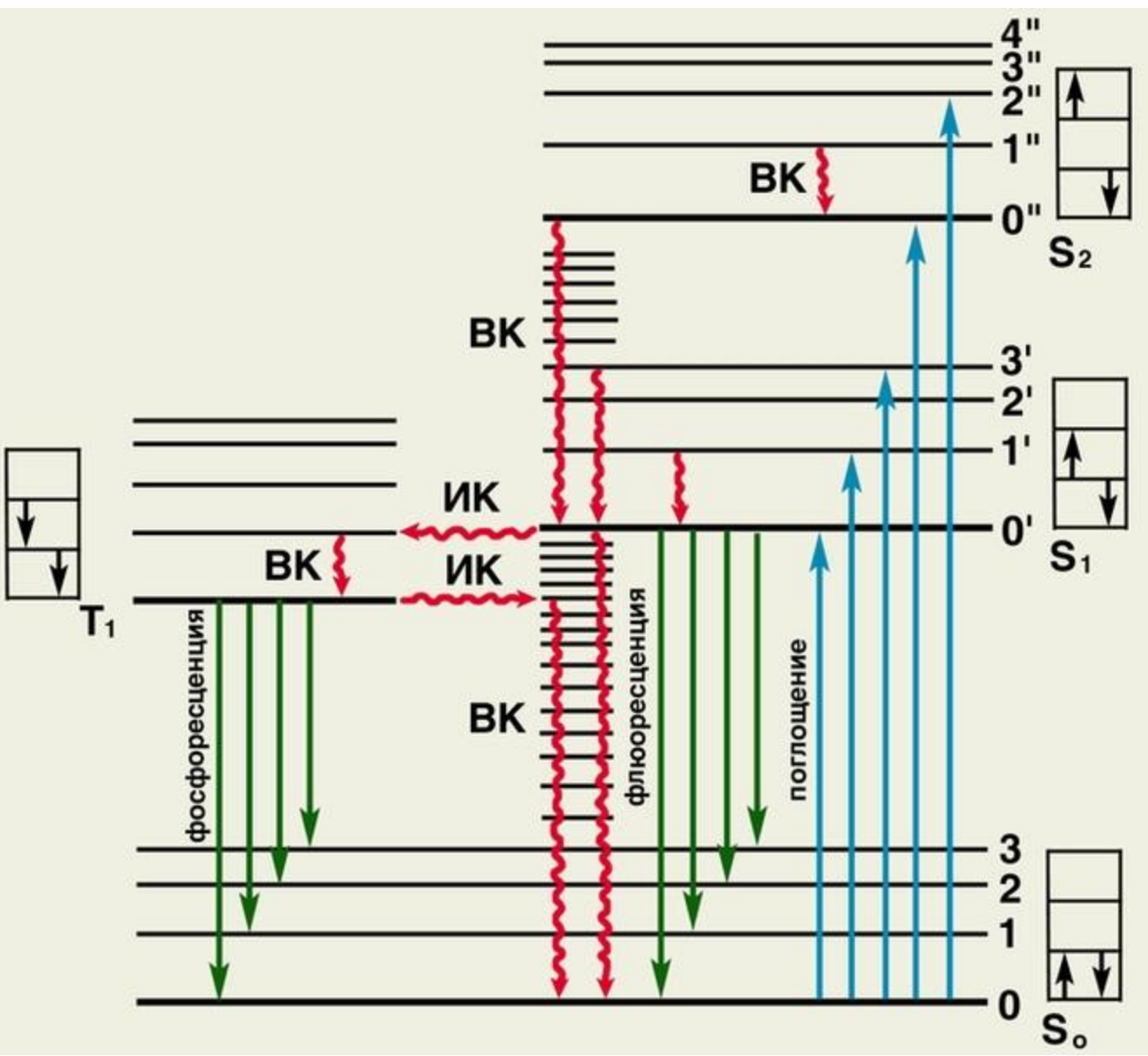
ЭЛЕКТРОННЫЕ ПЕРЕХОДЫ ПРИ ФОСФОРЕСЦЕНЦИИ



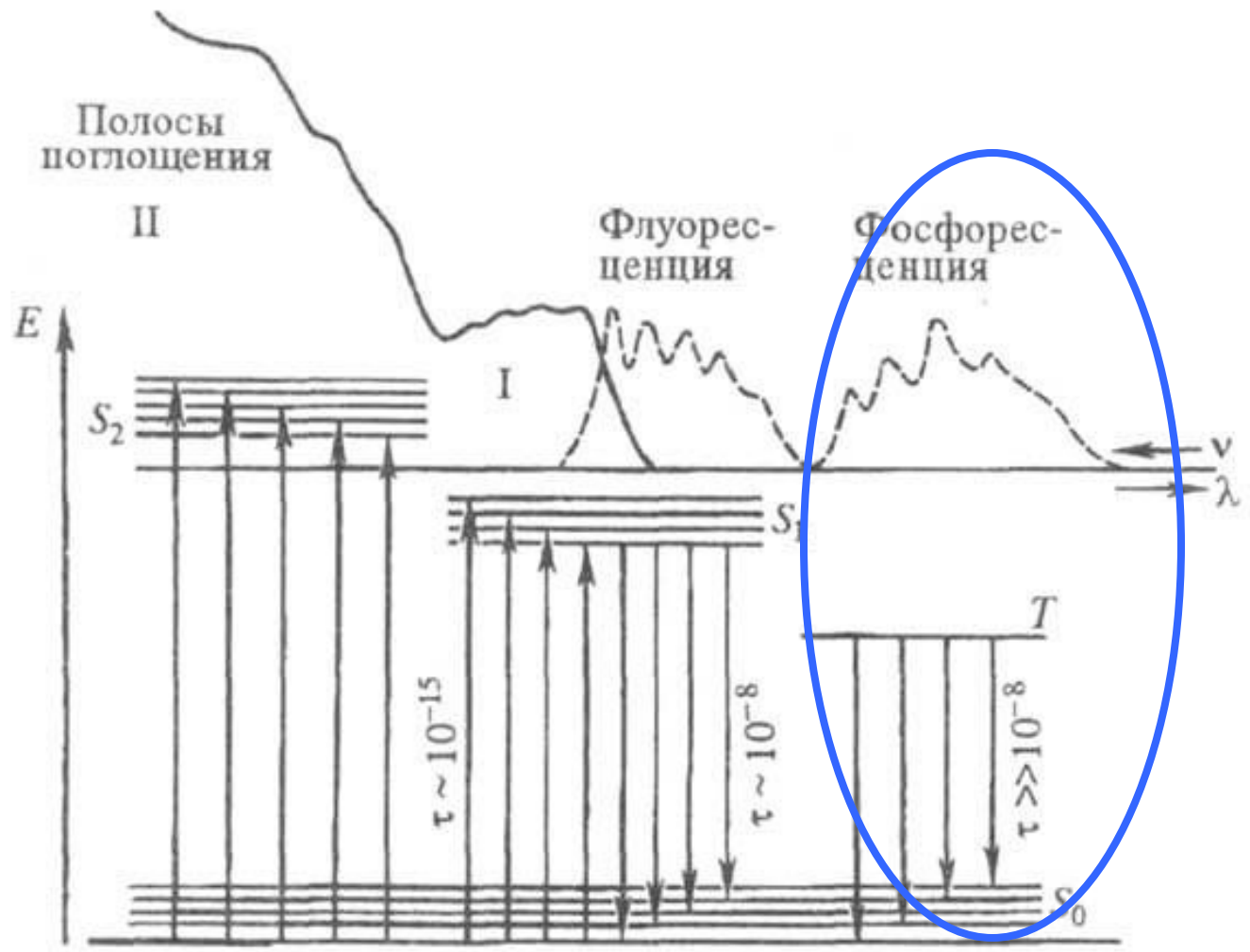
1 – ПОГЛОЩЕНИЕ

2 – ИНТЕРКОМБИНАЦИОННАЯ КОНВЕРСИЯ

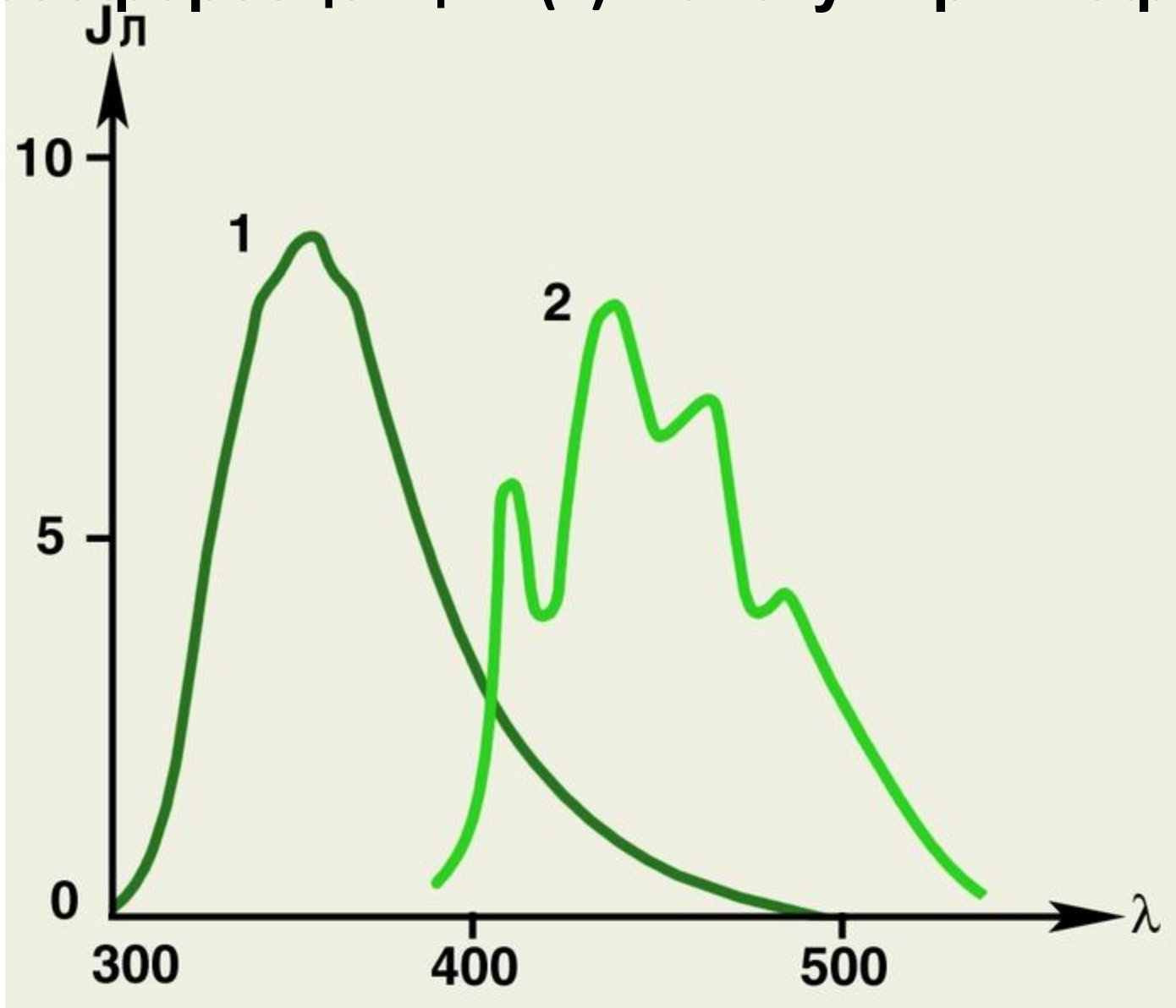
3 - ФОСФОРЕСЦЕНЦИЯ



ИК –
интеркомбинац
ионная
конверсия
ВК – внутренняя
конверсия



Спектры флуоресценции (1) и фосфоресценции (2) молекул триптофана



МЕТОДЫ ОБНАРУЖЕНИЯ ТРИПЛЕТНЫХ УРОВНЕЙ

□ЭПР

□ИМПУЛЬСНЫЙ ФОТОЛИЗ

□ТЕРМОЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ

□ИНФРАКРАСНАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ

ЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ И ЕЕ ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

ЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ

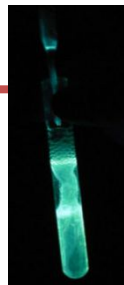
Вызвана
действием света

**СОБСТВЕННАЯ
ЛМ**

Обусловлена химическими
процессами,
протекающими в живых
клетках

ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ

Сверхслабое свечение в
инфракрасной или УФ-
области

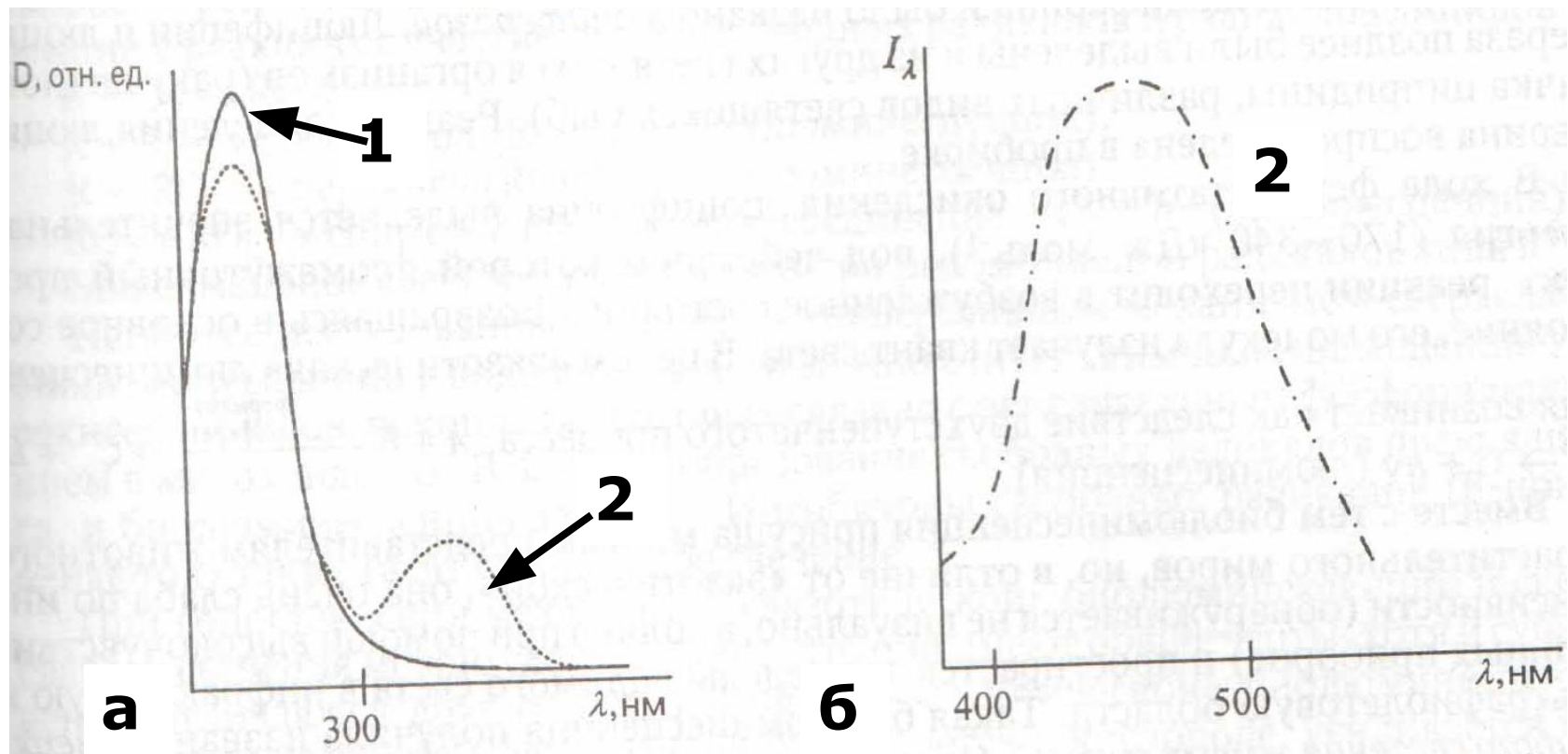


БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ

Обнаруживается
визуально

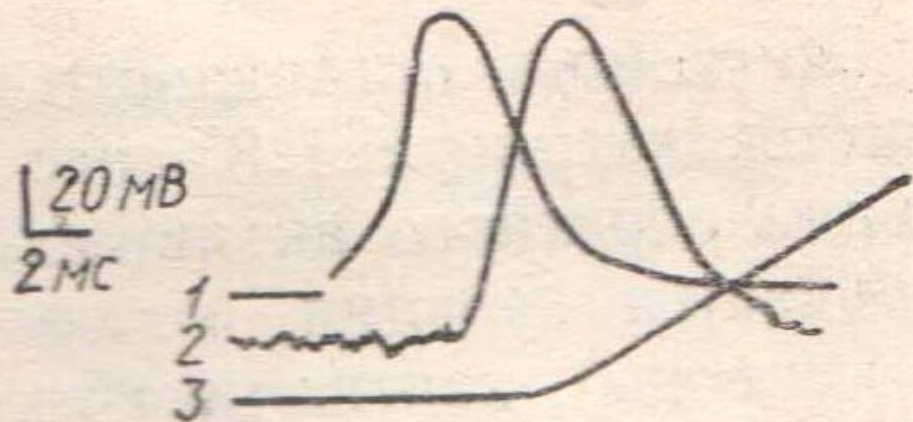


ИССЛЕДОВАНИЕ СОБСТВЕННОЙ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ БИОМАКРОМОЛЕКУЛ



Спектры поглощения (а) и спектр флуоресценции (б) НАД: окисленная(1) и восстановленная форма (2)

МЕТОД ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ ЗОНДОВ



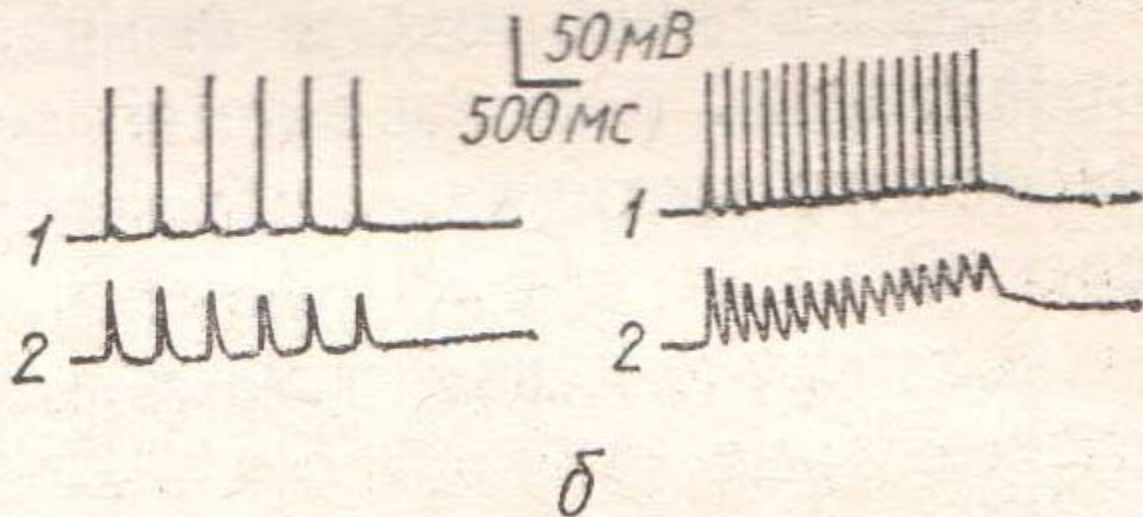
a

а, б – изменение $[Ca^{2+}]_{in}$,
обнаруженное с
помощью арсеназо

1 – ПД

2 – арсеназный
сигнал

3 – сокращение



б

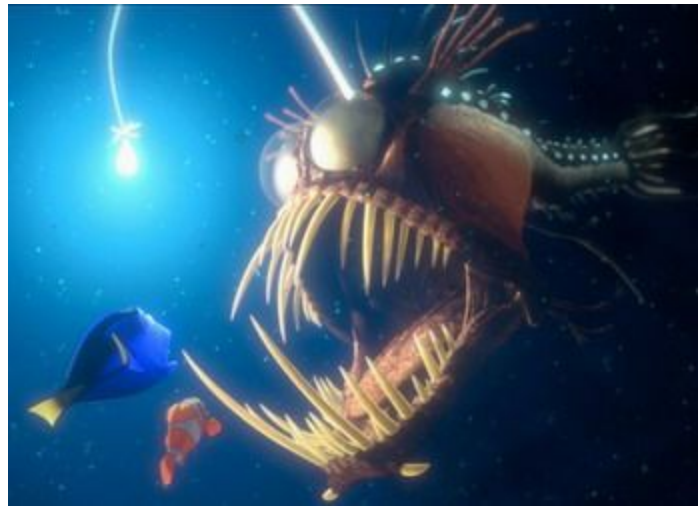


Озеро Гиппсленд в
Австралии

БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ -

видимое свечение некоторых живых организмов.

Это явление широко распространено в природе и наблюдается у бактерий, грибов, некоторых животных (жгутиконосцев, кишечнополостных, головоногих моллюсков, ракообразных, оболочников, насекомых, рыб).



Условия биолюминесценции

- энергия, выделяющаяся в ходе реакции должна превышать ~**41-71.5 ккал/моль**
- **разница энергий** основного и возбуждённого состояния продукта реакции должна быть **ниже** энтальпии химической реакции

ОБЩИЙ МЕХАНИЗМ:

ХИМИЧЕСКОЕ ПРЕВРАЩЕНИЕ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНОГО СУБСТРАТА (ЛЮЦИФЕРИНА), КАТАЛИЗИРУЕМОЕ ФЕРМЕНТОМ ЛЮЦИФЕРАЗА

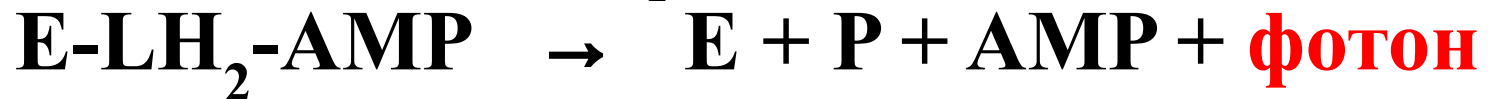
В процессе обмена веществ освобождённая энергия АТФ в присутствии кислорода при наличии Mg^{2+} и фермента **люциферазы** активизирует **люциферин**, в котором возникает электронное возбуждение с излучением энергии в виде света.



БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ СВЕТЛЯКОВ



В присутствии O_2 и Mg^{2+}



Здесь **AMP** - аденозинмонофосфат, **ПФ** - пирофосфат, **E** - люцифераза, **LH₂** - люциферин, **P** - продукт реакции (оксилюциферин) в основном состоянии.

Квантовые выходы билюминесценции очень высоки и достигают значений **0.1-1**.

Длина волны света, излучаемого при билюминесцентных процессах, зависит от разности энергий основного и возбуждённого состояний окислённых форм люциферинов и связана с ней отношением $\Delta E = h\nu$, полуширина полосы излучения составляет обычно **~50 нм**.

Максимум в спектре излучения в биолюминесцентных процессах может **изменяться** в зависимости от условий протекания реакции.

Например, несмотря на то, что химизм биолюминесценции жуков-светляков одинаков и структуры люциферина и оксилуциферина различных видов идентичны, цвет свечения может варьировать от зелёного до красного, то есть максимум в спектре излучения может меняться от 490 до 622 нм.

1 причина

Оксилюциферин может существовать в **нескольких формах с различной энергией** основного состояния.

Следовательно, различаются и **энергии перехода** из возбуждённого состояния.

РЕЗУЛЬТАТ: **различные максимумы** в спектре излучения при переходе из возбуждённого состояния в основное.

2 причина

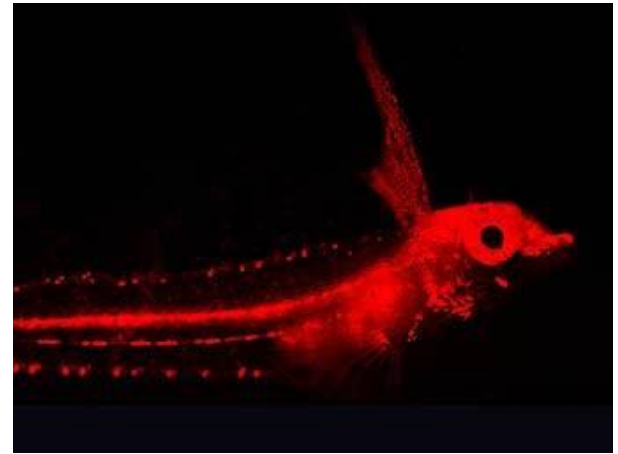
Микроокружение молекулы оксильюциферина в основном и возбуждённом состояниях.

Оксильюциферин взаимодействует с растворителем и образует водородные связи.

Чем **сильнее** возбуждённая молекула **ассоциирована с микроокружением** и чем выше его поляризуемость,

тем **ниже энергия** возбуждённого состояния, тем меньше энергия испускаемого фотона

и тем **сильнее сдвиг** максимума спектра излучения в **длинноволновую** область.



Функциональная роль биолуминесценции связана с такими аспектами поведения, как нападение, защита и коммуникация.



ПРАКТИЧЕСКОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ

1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ АТФ В РАЗЛИЧНЫХ ОБЪЕКТАХ

ОСНОВАНО НА БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ СВЕТЛЯКОВ:
ИСПОЛЬЗУЮТ СМЕСЬ ЛЮЦИФЕРИН-ЛЮЦИФЕРАЗА.

2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ

- **ФМН** (флавиномононуклеотид, является простетической группой различных оксидоредуктаз)
 - **ФАД** (флавинадениндинуклеотид — кофермент, принимающий участие во многих окислительно-восстановительных биохимических процессах).
 - НИЗКИХ КОНЦЕНТРАЦИЙ **КИСЛОРОДА**,
 - **АКТИВНОСТИ АНТИБИОТИКОВ**
- С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СВЕТЯЩИХСЯ БАКТЕРИЙ.

**СВЕРХСЛАБОЕ СВЕЧЕНИЕ
(СОБСТВЕННАЯ
ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ)**

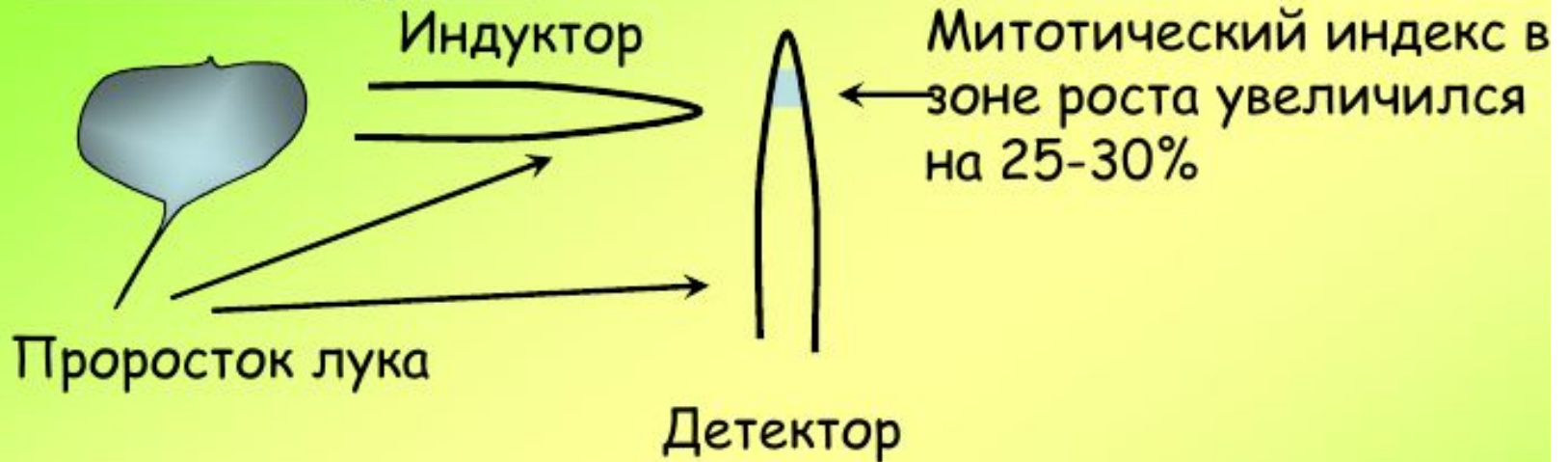


НАЧАЛО ИЗУЧЕНИЯ – РАБОТЫ А.Г.
ГУРВИЧА. ОТКРЫТИЕ ИМ В 1923Г.
«МИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ ЛУЧЕЙ»

Александр Гаврилович Гурвич
(1874 - 1954)

Митогенетические лучи (МЛ).

Опыт А. Г. Гурвича



Опыт 2



Стекло - индукция исчезла

Опыт 3



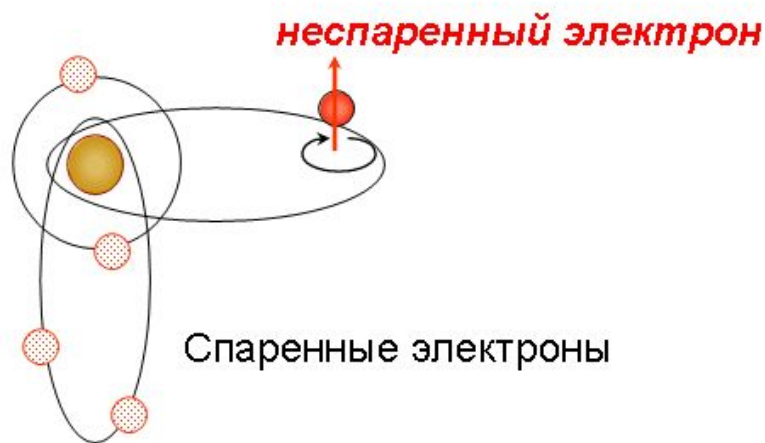
Кварц - индукция сохранилась

Собственная (слабая)
хемилюминесценция



Отличительные особенности свободных радикалов:

- наличие неспаренного электрона на внешнем энергетическом уровне;
- собственный магнитный момент;
- высокая химическая активность и малое время жизни;
- способность инициировать цепные реакции окисления.

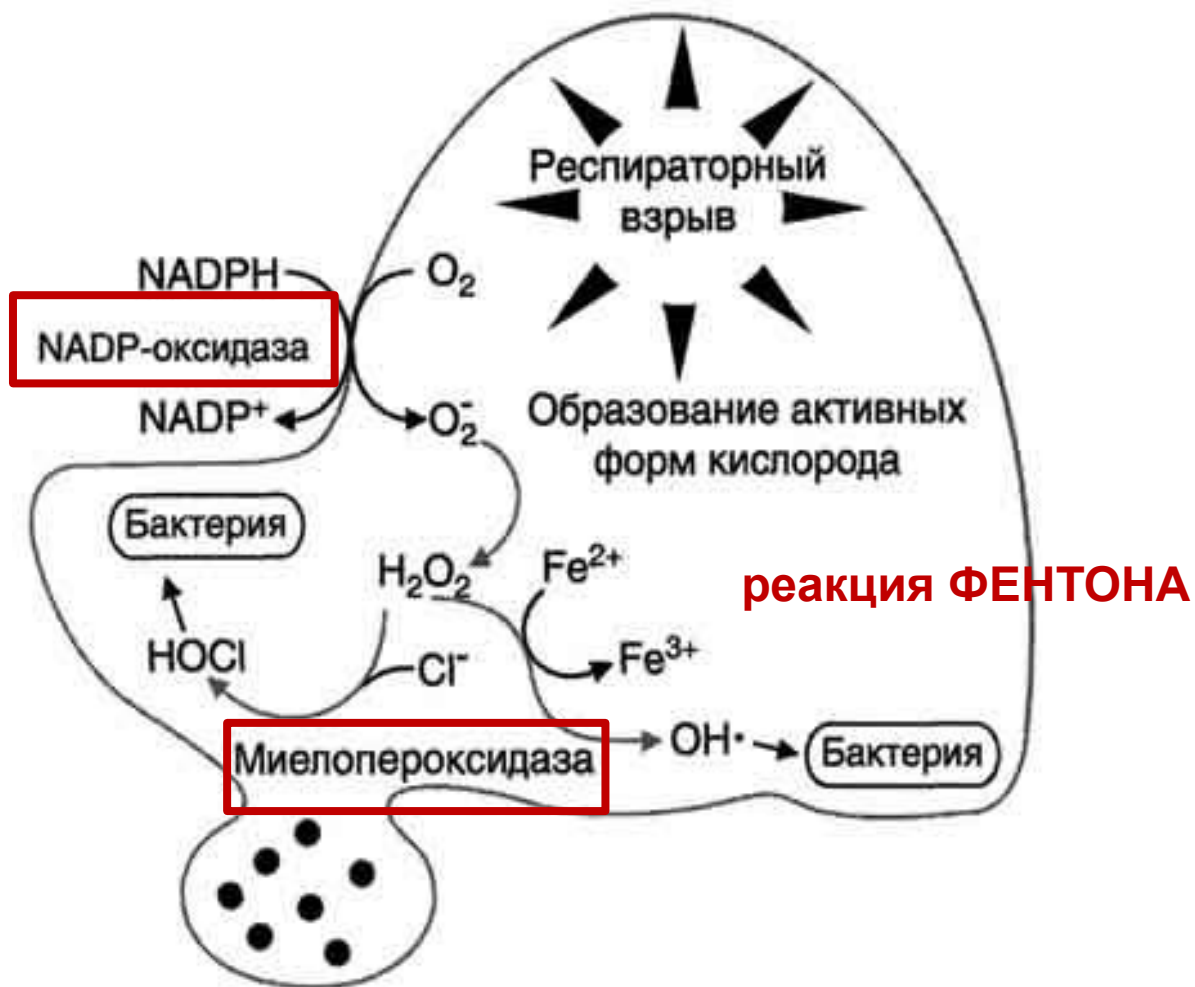


РЕАКЦИИ С УЧАСТИЕМ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА

ПРИМЕРЫ АФК:

- ПЕРЕКИСЬ ВОДОРОДА (H_2O_2),
- ГИПОХЛОРИТ (ClO^-),
- КИСЛОРОДНЫЕ РАДИКАЛЫ (СУПЕРОКСИД $\text{O}_2 \cdot^-$,
РАДИКАЛ ГИДРОКСИЛА $\text{HO} \cdot$).

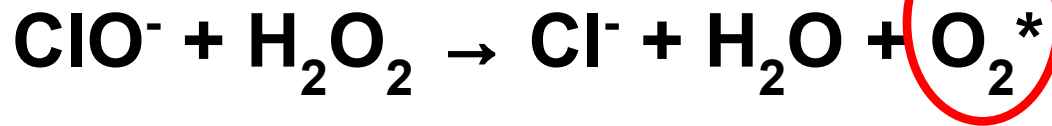
ИСТОЧНИК АФК – КЛЕТКИ-ФАГОЦИТЫ, КОТОРЫЕ СОДЕРЖАТ **NADP-ОКСИДАЗУ**, **МИЕЛОПЕРОКСИДАЗУ**



ПРИЧИНА ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ

ПЕРЕХОД КИСЛОРОДА В ВОЗБУЖДЕННОЕ
СИНГЛЕТНОЕ СОСТОЯНИЕ (O_2^*).

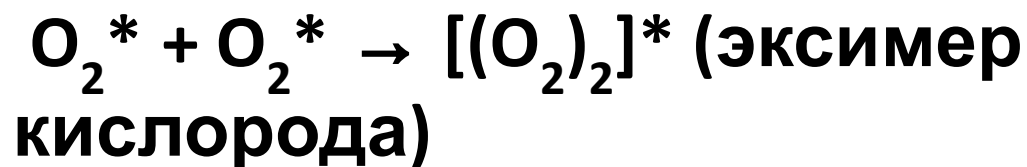
ВОЗБУЖДЕННЫЙ СИНГЛЕТНЫЙ КИСЛОРОД МОЖЕТ
ОБРАЗОВЫВАТЬСЯ ПРИ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ
КИСЛОРОДНЫХ РАДИКАЛОВ.



ПЕРЕХОД O_2^* В ОСНОВНОЕ СОСТОЯНИЕ
СОПРОВОЖДАЕТСЯ ВЫСВЕЧИВАНИЕМ КВАНТА



МОЛЕКУЛЫ СИНГЛЕТНОГО КИСЛОРОДА ОБРАЗУЮТ АКТИВНЫЕ **ДИМЕРЫ** (ЭКСИМЕРЫ), КОТОРЫЕ, ПЕРЕХОДЯ В ОСНОВНОЕ СОСТОЯНИЕ, ИСПУСКАЮТ **КВАНТЫ СВЕТА**.



СВЕЧЕНИЕ ПРИ ЦЕПНОМ ОКИСЛЕНИИ ЛИПИДОВ

Реакция цепного окисления липидов

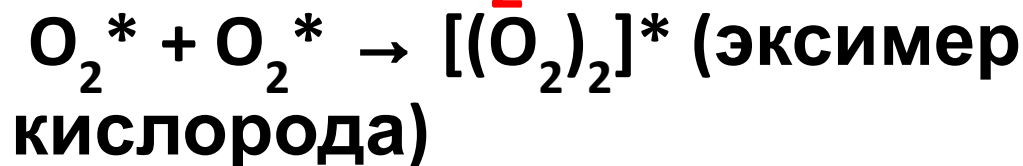


L• и LOO• - РАДИКАЛЫ ЛИПИДОВ И ЛИПОПЕРОКСИДЫ

РАДИКАЛЫ МОГУТ ВЗАИМОДЕЙСТВОВАТЬ ДРУГ С ДРУГОМ.

В ИТОГЕ ОБРАЗУЮТСЯ МОЛЕКУЛЫ КЕТОНА И **КИСЛОРОДА В ВОЗБУЖДЕННОМ СОСТОЯНИИ.**

ПРИ ПЕРЕХОДЕ В ОСНОВНОЕ СОСТОЯНИЕ ОНИ ИСПУСКАЮТ КВАНТЫ СВЕТА.



ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ В РЕАКЦИЯХ С УЧАСТИЕМ NO

ОКСИД АЗОТА ВЫДЕЛЯЕТСЯ МНОГИМИ ТИПАМИ КЛЕТОК И ЯВЛЯЕТСЯ РЕГУЛЯТОРОМ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ ПРОЦЕССОВ.

СВЕЧЕНИЕ НАБЛЮДАЛОСЬ В РАСТВОРАХ, СОДЕРЖАЩИХ **ОКСИД АЗОТА**, СУПЕРОКСИД И БЕЛОК.

ОКСИД АЗОТА И СУПЕРОКСИД ДАЮТ ПЕРОКСИНИТРИТ



СВЕЧЕНИЕ НАБЛЮДАЕТСЯ ПРИ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ ПЕРОКСИНИТРИТА С БЕЛКОМ

ОБЩИЙ МЕХАНИЗМ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ

- 1. ВОССТАНОВЛЕНИЕ** ОДНОГО ИЗ УЧАСТНИКОВ РЕАКЦИИ (ПРИСОЕДИНЕНИЕ ЭЛЕКТРОНА) И **ОКИСЛЕНИЕ** ДРУГОГО. ЭТО ПРИВОДИТ К ЗАПАСАНИЮ ХИМИЧЕСКОЙ ЭНЕРГИИ СИСТЕМЫ.
- 2. ПЕРЕНОС ЭЛЕКТРОНА** НА БОЛЕЕ ВЫСОКИЙ УРОВЕНЬ И ОБРАЗОВАНИЕ ЭЛЕКТРОННО-ВОЗБУЖДЕННОГО ПРОДУКТА.
- 3. ВЫСВЕЧИВАНИЕ ФОТОНА** ПРИ ПЕРЕХОДЕ МОЛЕКУЛЫ ИЗ ВОЗБУЖДЕННОГО В ОСНОВНОЕ СОСТОЯНИЕ.

НИЗКАЯ ИНТЕНСИВНОСТЬ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ

ПРИЧИНЫ

1. **низкая концентрация радикалов** в биосистемах из-за их высокой активности.
2. в большинстве окислительно-восстановительных взаимодействий между радикалами и молекулами электрон переносится **на нижний основной уровень** и высвечивания кванта не происходит.
3. **низкая вероятность высвечивания** кванта даже если и образовалась возбужденная молекула.

Квантовый выход образования
возбужденных молекул

$$Q_{\text{ВОЗБ}} = \frac{\text{доля возбужденных молекул продукта}}{\text{среди всех молекул продукта}}$$

$10^{-4}-10^{-5}$

Общий квантовый выход
ХЛ - $10^{-8}-10^{-10}$

ВЫВОД: УВЕЛИЧИТЬ

$Q_{\text{ВОЗБ}}$ И $Q_{\text{ЛЮМ}}$

**ПУТЕМ ПРИМЕНЕНИЯ
ХИМИЧЕСКИХ ИЛИ
ФИЗИЧЕСКИХ АКТИВАТОРОВ**

Квантовый выход
люминесценции
продукта реакции

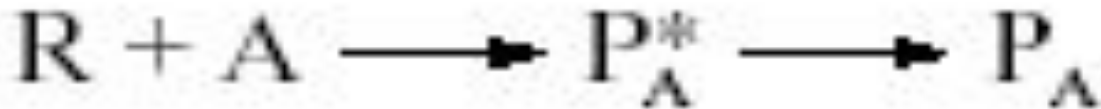
$$Q_{\text{ЛЮМ}} = \frac{\text{фотоны}}{\text{возбужденные молекулы}}$$

$10^{-4}-10^{-5}$

ХИМИЧЕСКИЕ АКТИВАТОРЫ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ

АКТИВАТОРЫ + **АФК** → ОБРАЗОВАНИЕ ПРОДУКТОВ В ВОЗБУЖДЕННОМ СОСТОЯНИИ.

СВЕЧЕНИЕ СВЯЗАНО С ПЕРЕХОДОМ ЭТИХ ПРОДУКТОВ В ОСНОВНОЕ СОСТОЯНИЕ



ЗДЕСЬ **R** – РАДИКАЛ, **A** – ХИМИЧЕСКИЙ АКТИВАТОР,

P – ОТВЕТСТВЕННЫЙ ЗА ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЮ ПРОДУКТ ПРЕВРАЩЕНИЯ МОЛЕКУЛЫ АКТИВАТОРА В ВОЗБУЖДЕННОМ (**P_A^{*}**) И ОСНОВНОМ (**P_A**) ЭЛЕКТРОННОМ СОСТОЯНИЯХ

ПРИМЕР АКТИВАТОРОВ: ЛЮМИНОЛ

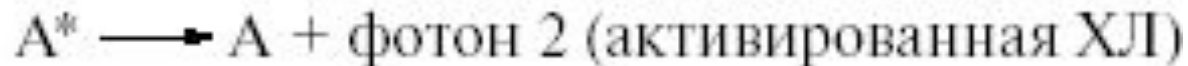
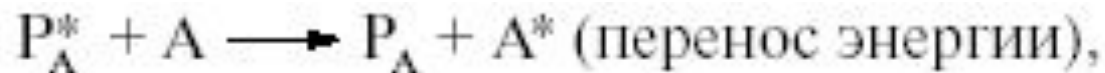
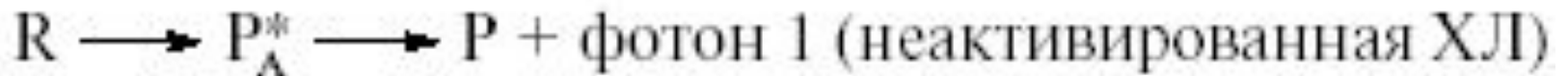


Рис. 1. Химические превращения люминола под действием активных форм кислорода – радикалов гидроксила и супероксида. Продукт реакций 3-аминофталат образуется в электронно-возбужденном состоянии и переходит в основное состояние с испусканием кванта света

ФИЗИЧЕСКИЕ АКТИВАТОРЫ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ

ФИЗИЧЕСКИЕ АКТИВАТОРЫ НЕ ВСТУПАЮТ В ХИМИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ, НО МНОГОКРАТНО УСИЛИВАЮТ ИНТЕНСИВНОСТЬ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ.

МЕХАНИЗМ: **МИГРАЦИЯ ЭНЕРГИИ** С МОЛЕКУЛЫ ПРОДУКТА ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНОЙ РЕАКЦИИ НА АКТИВАТОР



ПРИМЕРЫ ФИЗИЧЕСКИХ АКТИВАТОРОВ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ

НЕКОТОРЫЕ ЛЮМИНЕСЦИРУЮЩИЕ СОЕДИНЕНИЯ,
ПРИМЕНЯЕМЫЕ ДЛЯ УСИЛЕНИЯ
ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ ПРИ ЦЕПНОМ ОКИСЛЕНИИ
ЛИПИДОВ



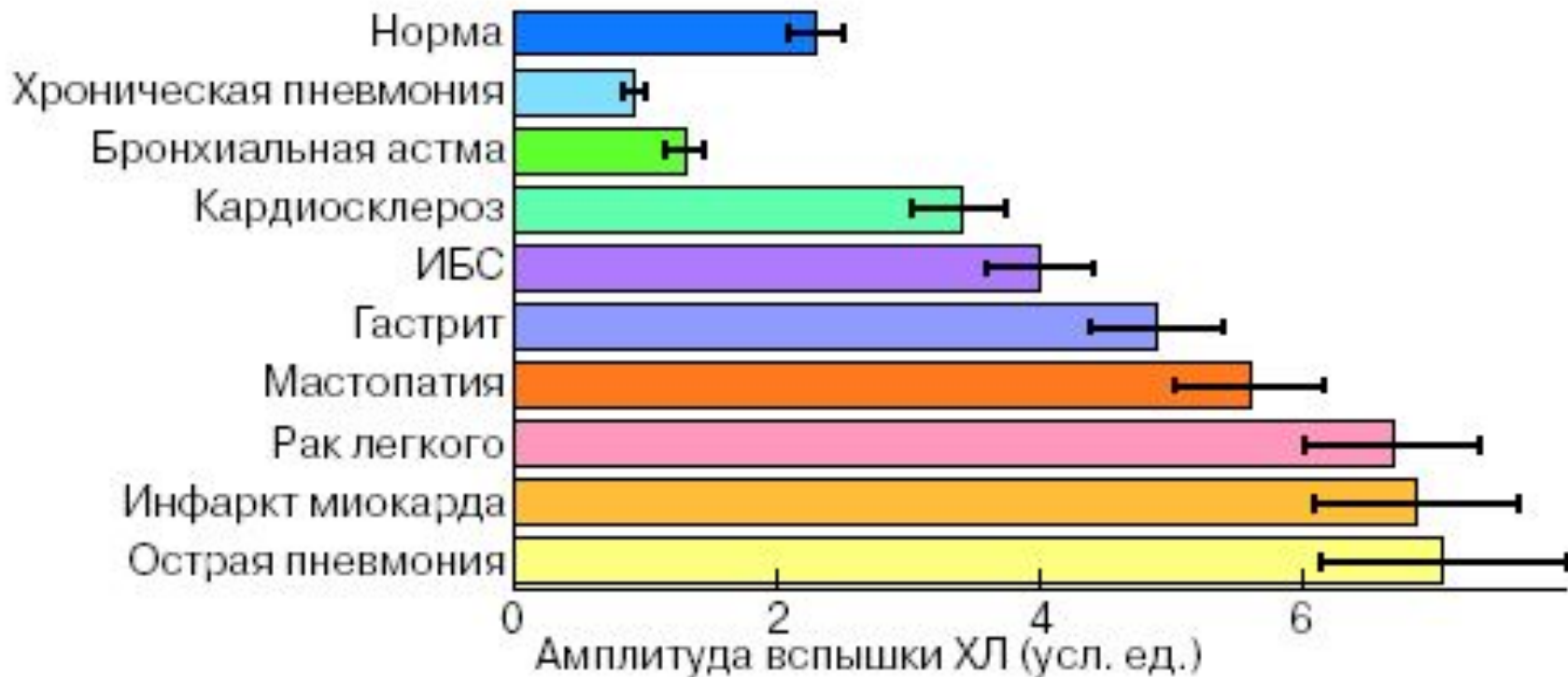
Что дает изучение ХЛ для медицины?

1. Изучение механизма реакций, сопровождающихся свечением (ХЛ-реакции).
 - Изучение первичных стадий фотобиологических процессов.
 - Изучение цепного окисления липидов.
 - Изучение «активных форм кислорода».
 - Изучение механизма действия антиоксидантов.
2. Применение ХЛ в лабораторной клинической диагностике.
 - Оценка уровня свободных радикалов.
 - Определение активности фагоцитов.
 - Определение окисляемости липопротеинов.
 - Определение антиоксидантов.





**ORMED-Lum –
современный
высокотехнологичный
аппаратно-
программный
комплекс,
предназначенный
для регистрации
сверхслабых
световых потоков,
сопровожающих
биохимические
реакции, физические
и биологические
процессы,
протекающие с
образованием
свободных
радикалов
(хемилюминесценция
, биолуминесценция).**



АМПЛИТУДА ХЛ-ОТВЕТОВ ИЗОЛИРОВАННЫХ ЛЕЙКОЦИТОВ КРОВИ, ПОЛУЧЕННОЙ ОТ БОЛЬНЫХ С РАЗНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ