

Часть I

Спонтанное сверхслабое свечение (биохемилюминесценция) тканей, клеток и биосубстратов животных

Введение

Квантовой биофизикой (квантовой биологией) является раздел биологии, изучающий участие в метаболизме эндогенных электронных возбужденных состояний (ЭВС) и излучаемых ими квантов света [86, 289].

Основоположителем квантовой биофизики животных является Б. Н. Тарусов, который вместе с сотрудниками в 1961 г. открыл эндогенное, спонтанное сверхслабое прижизненное свечение — биохемилюминесценцию в области 360–1200 нм с поверхности органов — мозга, мышц и печени крыс и кроликов (табл. 1). Тем самым было показано участие в метаболизме животных ЭВС, излучающих кванты видимого света [207, 284].

Таблица 1

Прижизненная спонтанная хемилюминесценция органов крыс:
имп./см²·мин, t = 37 °C

Орган	Фон установки	Время регистрации сверхслабого свечения, мин	
		10	60
Печень	23 ± 0,7	43 ± 0,8	54 ± 0,7
Головной мозг	26 ± 0,7	47 ± 0,5	47 ± 0,9
Мышцы брюшной стенки	28 ± 0,7	43 ± 1,7	41 ± 0,6
Кишечник	28 ± 0,7	39 ± 0,4	41 ± 0,3

В 1961 г. обнаружено спонтанное свечение (хемилюминесценция) ненасыщенных жирных кислот, как свободных, так и входящих в состав жиров и фосфолипидов [207]. Было установлено, что липиды являются основным энергетическим субстратом электронного возбуждения и спонтанной биохемилюминесценции тканей животных.

Именно липиды оказались нашим «внутренним солнцем», генерирующим ЭВС и излучающим свет. Свечение липидов, выделенных из тканей, было на 1–2 порядка (10^2 кв/с·см²) интенсивнее, чем свечение (10^1 кв/с·см²) органов животных в том же диапазоне (360–1200 нм).

Проблема участия квантов света в метаболизме животных была поставлена в работах В. В. Лепешкина [270] и А. Г. Гурвича [60].

В 1933 г. В. В. Лепешкин обнаружил потемнение (засветку) фотопластинок, лежащих на биопрепаратах. Он считал, что это ультрафиолетовое излучение возникает при гибели клеток и коагуляции их протоплазмы, и назвал его некробиотическим.

А. Г. Гурвич предполагал, что если белки активно поглощают ультрафиолет (УФ) (160, 230 и 280 нм), то они «должны спонтанно излучать в той же области». Он создал **гипотезу** митогенетического излучения, согласно которой попадание в клетку по крайней мере одного УФ-кванта вызывает ее деление (митоз). В свою очередь, делящаяся клетка за счет полимеризации белков сама излучает квант УФ. По мнению А. Г. Гурвича, липиды не излучают.

Эта гипотеза в свое время стала очень популярной и стимулировала попытки зарегистрировать митогенетическое излучение современными оптическими методами, что не увенчалось успехом. Открытое в 1961 г. прижизненное метаболическое спонтанное сверхслабое свечение тканей млекопитающих отличается от предполагаемого А. Г. Гурвичем излучения по всем параметрам (табл. 2).

Таблица 2

**Сравнительная оценка митогенетического излучения
и сверхслабого свечения тканей**

Критерии	Митогенетическое (предполагаемое) излучение (по Гурвичу А. Г.)	Метаболическое сверхслабое свечение (по Тарусову Б. Н.)
Спектр	160–320 нм	360–1200 нм
Энергетический субстрат	Белки	Липиды
Биологическая роль	Митоз	Биоэнергетика
Метод изучения	Субъективный Визуальный	Объективный — с помощью электронно-оптической установки [1, 142]

Общебиологическое значение открытия Б. Н. Тарусова заключается в преодолении разрыва между биологией и фундаментальными науками — физикой и химией. Не случайно Б. Н. Тарусов считал, что биофизика — это физико-химия биологических процессов и систем. Основанием для этого определения являются представления о том, что химические, физико-химические и биохимические процессы осуществляются в основном активными формами вещества:

а) ионами и диполями $R^+ R^-$, химическая активность которых определяется их электрическим полем, создаваемым некомпенсированными электрическими зарядами;

б) свободными радикалами, химическая активность которых определяется магнитным полем, создаваемым их неспаренными электронами: $R^\cdot, R\uparrow$;

в) электронными возбужденными состояниями (ЭВС) R^* , химическая активность которых определяется потенциальной энергией электрона, переведенного на более высокий энергетический (низший незаполненный) уровень.

Поэтому биофизика должна рассматривать не три типа частиц: электроны, протоны и нейтроны [46], а еще и кванты. До открытия Б. Н. Тарусова, т. е. до 1961 г., квантовые процессы не учитывались при изучении нормального метаболизма животных. Таким образом, до этого времени исключалось из рассмотрения 30% физико-химических процессов, протекающих в тканях животных на электронных возбужденных уровнях. Это делало биологию весьма ограниченной научной дисциплиной. Приблизительно так же, как до открытия Л. Гальвани биология обходилась без учета электрических явлений и роли ионов и диполей в организме животных. Открытия Л. Гальвани и Б. Н. Тарусова можно считать равновеликими.

Решением Первого Всемирного учредительского биофизического конгресса в 1961 г. в Стокгольме биофизика была разделена на следующие 3 раздела: биофизика клетки, молекулярная и биофизика систем, т. е. даже в биофизике до 1961 г. отсутствовал раздел квантовой биофизики.

В монографии М. В. Волькенштейна «Молекулы и жизнь» (1965 г.) неоднократно повторялось, что внутренняя среда живого организма является темновой, т. е. лишенной и квантов, и возбужденных электронных состояний.

Еще в 1960 г. А. Сент-Дьердьи писал, что никому до сих пор не удалось обнаружить при окислительном метаболизме квантов с большой энергией, характерной для видимого диапазона. Он предлагал искать их в реакциях в липидной среде [197].

Отсутствие сведений об экспериментальном обнаружении и изучении квантовых процессов в организме тормозило появление квантовой биофизики как одной из дисциплин биологии.

К шестидесятым годам были созданы чувствительные датчики слабых световых потоков — фотоэлектронные умножители (ФЭУ) с внутренними фотокатодами. Их основной недостаток — высокий уровень тепловых шумов, значительно превышающих световой сигнал — излучение тканей животных.

Для снижения термозумов Р. Ф. Васильев [41] и Ю. А. Владимиров [51] пытались охлаждать ФЭУ, опуская его в сосуд Дюара с жидким азотом и двумя специальными кварцевыми окнами в его стенках. Тем не менее происходило неизбежное светорассеяние и поглощение на этих двух окнах и в слое кипящего азота при прохождении света от источника к фотокатоду, и сверхслабые свечения не были зафиксированы [51].

Экспериментальное обнаружение спонтанного свечения тканей животных, которое является по интенсивности сверхслабым (невидимым невооруженным глазом), стало возможным благодаря созданию установки с повышенной чувствительностью [79, 92, 153, 207].

Б. Н. Тарусовым, А. И. Поливодой, А. И. Журавлевым стеклянный сосуд Дюара был заменен пенопластовым сосудом, в отверстие в стенке которого вдавливалось окно — сосок ФЭУ. Тем самым исключались и 2 рассеивающих окна, и слой кипящего азота, что и дало возможность зафиксировать свечение тканей животных (рис. 1).

Приоритет этого открытия подтверждается многими исследователями [13], в том числе академиком Ю. А. Владимировым в его монографии [47].

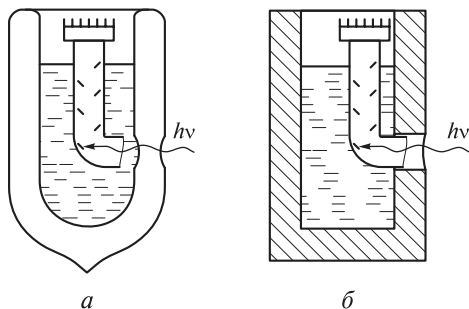


Рис. 1. Конструкция блока датчиков для измерения: *а*) слабых световых сигналов с $J > 10^5$ кв/с·см² по методу Р. Ф. Васильева (1959), Ю. А. Владимирова. (1959) [31]; *б*) сверхслабых световых потоков с $J = n \cdot 10^1 - n \cdot 10^3$ кв/с·см² по методу Б. Н. Тарусова, А. И. Журавлева (1961) [1]

Открытие спонтанной биохемилюминесценции завершило формирование квантовой биофизики как дисциплины, состоящей из четырех основных разделов:

- I. *Спонтанное сверхслабое свечение (ССС)*, или биохемилюминесценция тканей животных, — явление, которое заключается в генерации излучения *эндогенных*, инициированных химическими реакциями электронных возбужденных состояний (ЭВС). СССР дает возможность прямого прижизненного определения концентрации эндогенных ЭВС и динамики их превращений в процессе метаболизма.
- II. *Фотобиофизика* изучает резонансное поглощение электромагнитного излучения оптического диапазона молекулами биосубстратов с последующим индуцированием ЭВС и их излучением в виде флуоресценции или фосфоресценции. Такая индуцированная люминесценция дает возможность определять молекулярную структуру и физико-химические свойства поглощающих молекул и их ЭВС, а также их изменения под влиянием различных физических и химических воздействий.
- III. *Ультразвуковое свечение* дополняет эти разделы, так как позволяет изучать свойства воды как основной *среды* живых организмов и среды их обитания.
- IV. *Хемилюминесцентный анализ*.

Терминология

Целесообразно однозначно использовать термины, определяющие свечение биологических объектов.

Усиливающие биохемилюминесценцию

Инициатор — химически активное вещество, создающее первичные активные центры и тем увеличивающее скорость реакции (ω), поставляющее активные продукты и изменяющее квантовый выход возбуждения (Φ_v), например, перекиси.

Индуктор — физический энергетический фактор (ультразвук, ионизирующая радиация), создающий–индуцирующий, новые активные центры и изменяющий ω .

Катализатор — вещество, ускоряющее биохемилюминесцентную реакцию, например ионы меди, железа, кобальта.

Стимулятор (бактерии, зимозан, кристаллы бария) — агент, на который фагоциты реагируют потоком кислородных радикалов, что

является естественным защитным (спонтанным) физиологическим процессом.

Активатор — вещество, имеющее высокий квантовый выход излучения и усиливающее свечение за счет физического процесса миграции («перехвата») энергии ЭВС с первично-возбужденных центров (эргостерин, акридиновый оранжевый, лантаноиды). Изменяет $\Phi_{\text{изл.}}$ и не влияет на ω и $\Phi_{\text{возб.}}$.

Зонд — вещество, реагирующее с активными метаболитами (перекисями, радикалами) с последовательным образованием собственных перекисей и ЭВС и высвечиванием с высоким квантовым выходом излучения (люминол, люцигенин).

Триггер — биологический агент, запускающий биолюминесцентную реакцию (например, АТФ), возможно, по механизму типа аллостерической активации.

Ослабляющие биолюминесценцию

Ингибитор — антиокислитель — химически активное вещество, тормозящее реакцию и снижающее ω (токоферол, витамин К, глутатион).

Разбавитель — инертное вещество (например, холестерин и насыщенные жирные кислоты), заменяющее энергетический субстрат реакции (ненасыщенные жирные кислоты, фосфолипиды) и тем снижающее ω .

Тушитель — вещество, имеющее более низкий квантовый выход излучения, чем первичные ЭВС, и снижающее суммарную интенсивность свечения за счет физического процесса миграции на него энергии первичных ЭВС, снижая $\Phi_{\text{изл.}}$ (каротин, O_2 , H_2O , CO_2 , гем).

Светофильтр — вещество, поглощающее свет.

Задания

1. Спектр, субстрат и биологическая роль обнаруженного Б. Н. Тарусовым прижизненного свечения тканей животных.
2. Каковы представления о мощности биоэнергетики до открытия метаболического свечения.
3. Каким было усовершенствование датчика, позволившее обнаружить свечения тканей животных.

Глава 1

Установки и методы измерения спонтанной биохемилюминесценции

1.1. Метод Б. Н. Тарусова и установка для измерения спонтанного сверхслабого свечения тканей и клеток животных

Спонтанной биохемилюминесценцией мы считаем свечение живых тканей, клеток и нативных биосубстратов, в которых не изменена искусственно концентрация эндогенно генерируемых электронно-возбужденных состояний (ЭВС).

Несколько труднее определить понятия — сверхслабые и слабые световые потоки. К сверхслабым мы относим невидимые невооруженным глазом световые потоки с интенсивностями, очевидно, в пределах $n \cdot 10^1 - n \cdot 10^3$ квантов/с·см², попадающих на фотокатод ФЭУ. К слабым следует отнести световые потоки, которые адаптируемым в темноте глазом улавливаются как слабое мерцание. Их интенсивность, очевидно, порядка $10^5 - 10^6$ квантов/с·см².

Наиболее чувствительными датчиками (детекторами) слабых и сверхслабых световых потоков являются созданные в 1934 г. советским инженером Л. А. Кубецким фотоэлектронные умножители — ФЭУ [134]. ФЭУ — электровакуумный прибор, в котором Л. А. Кубецкий создал сопряжение двух принципов: фотоэффекта и вторичной динотронной эмиссии в электрическом поле и в вакууме. Фотоэлектронный умножитель:

а) детектирует на фотокатоде излучаемый объектом световой сигнал — I_{hv} ;

б) преобразует на фотокатоде световой сигнал (поток квантов) в электрический сигнал (поток первичных фотоэлектронов) за счет фотоэффекта («выбивания» квантами первичных фотоэлектронов на фотокатоде);

в) создает направленный поток электронов за счет приложенной разности потенциалов между фотокатодом и анодом ФЭУ в вакууме;

г) усиливает сигнал в несколько миллионов раз за счет выбивания первичными электронами вторичных электронов (динотронный эффект) на нескольких вторичных электродах (динодах) (рис. 2).

Величина анодного тока, выходного анодного сигнала — $I_A = I_{hv} P_{ф.к} \sigma^1 \sigma^{n-1} k$ и зависит от:

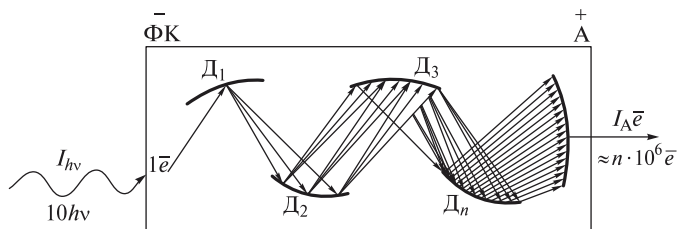


Рис. 2. Фотоэлектронный умножитель с внешним фотокатодом:
ФК — фотокатод; А — анод; Д — диноды

I_{hv} — интенсивности измеряемого светового сигнала объекта, выражающегося в люменах, или числом квантов, падающих на фотокатод;

$P_{ф.к}$ — квантового выхода фотокатада;

$P_{ф.к} = (\text{число электронов, выбитых из фотокатада}) / (\text{число квантов, падающих на фотокатод})$.

Для современных ФЭУ квантовый выход фотокатадов в различных участках спектра колеблется от 1% (0,01) до 25% (0,25) и в среднем в рабочей области фотокатада может быть принят равным 10% (0,1) (рис. 3).

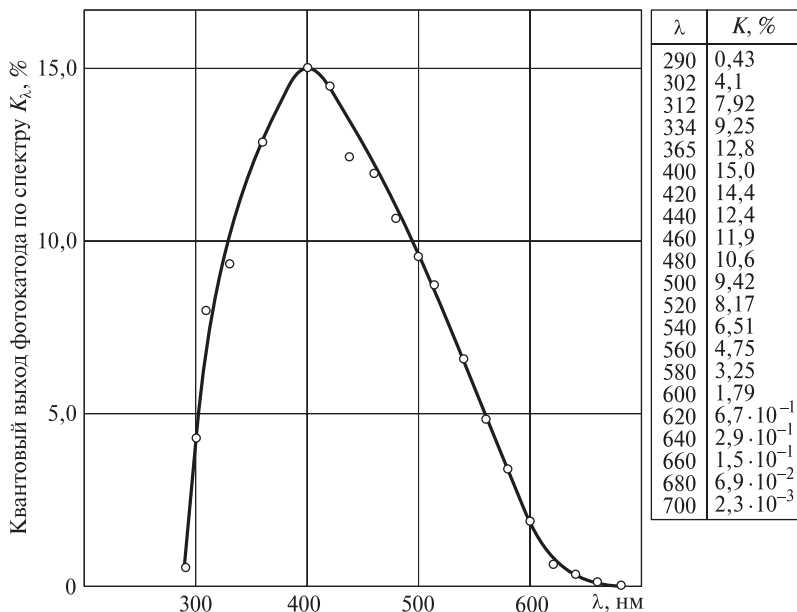


Рис. 3. Спектральная чувствительность (зависимость квантового выхода фотокатада от спектра падающего на фотокатод света) сурьмяно-цезиевого фотокатада: λ — длина волны в нм; K — квантовый выход в %

σ — выход диотронной эмиссии, определяемой отношением:

$\sigma = (\text{число электронов, выбитых из вторичного электрода — динода}) / (\text{число электродов, бомбардирующих динод})$.

В вакууме ФЭУ для большинства применяемых материалов для динодов выход диотронной эмиссии колеблется в пределах: $2 \leq \sigma \leq 4$.

Для первого динода, изготавливаемого из дорогостоящих материалов — фосфида галлия или арсенида галлия, выход первого динода $20 \leq \sigma_1 \leq 40$, достаточен, чтобы почти все первичные фотоэлектроны были зарегистрированы на первом диноде.

n — число вторичных электродов-динодов, которые в современных ФЭУ колеблется от 8 до 22.

k — коэффициент (%) сбора от числа электронов, эмиттируемых предыдущим динодом и улавливаемых на последующем диноде, что зависит от конструкции (формы) динодов.

Попадание на фотокатод каждых десяти квантов дает в среднем на аноде один импульс, формируемый потоком из нескольких миллионов электронов. При $\sigma \approx 3$ $n = 10-18$, число электронов, достигающих анода, превышает число квантов, падающих на фотокатод в несколько миллионов раз.

Величина выходного, конечного сигнала ФЭУ на его аноде (анодный ток, анодная чувствительность) выражается или числом вторичных электронов, или их суммарным зарядом, достигшим анода, в единицу времени — I_A . Для современных ФЭУ интегральная анодная чувствительность равна: 100–1000 ампер на люмен (А/лм), что достаточно для устойчивой регистрации как **суммарного тока**, так и **отдельных импульсов**.

В 1961 г. Б. Н. Тарусовым и его сотрудниками была создана типовая установка для измерения сверхслабых световых потоков от биологических объектов, принципы конструирования которой в настоящее время применяются всеми исследователями и сводятся к следующему [153, 207, 229].

1. Устранение промежуточных поглощающих и рассеивающих поверхностей и сред, что одновременно сокращает путь излучения (сигнала) от биологических объектов к фотокатоду ФЭУ.

2. Максимальное (не более 12 мм) приближение объекта к фотокатоду ФЭУ для увеличения светосбора без применения световодов. Этот принцип был осуществлен и осуществляется теперь применением фотозатворов, что давало возможность работать в освещенном, а не в затемненном помещении, непрерывно контролировать отношение сигнал/фон или интенсивность стандартного образца (светодиод, урановое стекло ЖС-19 и др.).

3. Впервые было применено разделение термобарьером (полиэтиленовой пленкой) блоков ФЭУ и блока объекта, что позволяло при постоянной температуре, а значит, и при постоянном уровне шумов ФЭУ, варьировать температуру исследуемого объекта от 5 °С до 70 °С. Наиболее приемлемым стабилизатором температуры камеры ФЭУ и регулятором температуры камеры объекта оказались водяные термостаты.

4. Выбрано оптимальное расположение объектов исследования (сыворотка, плазма, моча, суспензии клеток) над фотокатодом ФЭУ в цилиндрических кюветах с плоским оптическим дном, площадью, равной или меньшей площади фотокатода, что обеспечивало максимальное приближение и максимальный светосбор $\approx 4\%$, и исключало затопевание фотокатода, теплообмен и нагревание ФЭУ.

5. Применение кассет с граничными светофильтрами позволило определять спектральные характеристики без увеличения расстояния объект–фотокатод (не более 12 мм).

6. Впервые в 1961 г. для регистрации световых потоков была применена аппаратура для изотопного анализа, работающая в импульсном дискретном (квантометрическом) режиме, что и дало возможность регистрировать световые потоки до $\approx n \cdot 10$ квантов/с, попадающих на фотокатод ФЭУ.

Созданная в 1961 г. с использованием указанных принципов установка оказалась на 1–2 порядка чувствительнее применяемых в то время приборов с регистрацией сигнала в токовом режиме и стала типовой для последующих конструкций (рис. 4) [153, 207].

С развитием радиоэлектроники стали широко применять интегральные схемы. Уже к 1974 г. В. С. Маренковым были созданы лабораторные образцы портативных установок для измерения сверхслабых излучений биологических объектов [153].

По заказу биологов наша промышленность к 1964 г. разработала лучшее в мире для того времени малошумящие ФЭУ-42 с внешним фотокатодом. ФЭУ-42 позволили отказаться от охлаждения жидким азотом, что сделало метод доступным для большого количества исследователей. Наличие внешнего фотокатода позволило еще больше сократить расстояние объект–фотокатод и повысить чувствительность установок [153]. К настоящему времени отечественная промышленность сделала еще один революционный шаг с повышением на порядок чувствительности ФЭУ. Созданы отечественные типы: ФЭУ-130 и ФЭУ-140 с внешним фотокатодом и с коэффициентом вторичной эмиссии на первом диноде из фосфида галлия = 20–40 (вместо 2–4). Эти ФЭУ позволили полностью отказаться от охлаждения [92]. Более подробно рассмотрены принципы работы ФЭУ во второй части настоящей монографии в гл. 3.

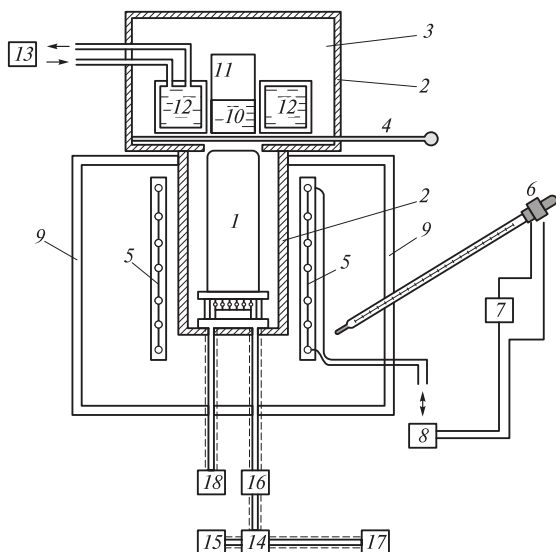


Рис. 4. Блок-схема типовой установки для измерения сверхслабых световых сигналов. 1 — ФЭУ; 2 — светозащитный и термостатирующий кожух для ФЭУ; 3 — светозащитная камера для объекта; 4 — фотоэлектрод; 5 — испаритель холодильного агрегата для охлаждения ФЭУ; 6 — контактный термометр-терморегулятор; 7 — электронное реле терморегулятора; 8 — электродвигатель компрессора холодильного агрегата; 9 — внешняя светозащитная и теплоизоляционная камера; 10 — объект; 11 — кювета для объекта; 12 — водяная ячейка термостата для объекта; 13 — водяной ультра термостат; 14 — широкополосный усилитель; 15 — стабилизированный высоковольтный блок питания; 16 — предусилитель; 17 — регистрирующее устройство; 18 — высоковольтный стабилизированный источник питания для ФЭУ

Теперь метод измерения спонтанных сверхслабых световых потоков стал доступен работникам практических клинических и ветеринарных лабораторий.

Методика измерения спонтанного сверхслабого свечения включает следующие основные этапы [95].

1. Подбор стандартного источника излучения (стандарта), лучше всего уранового стекла — ЖС-19 с постоянной интенсивностью излучения, превышающей среднюю интенсивность свечения исследуемых объектов не более чем в 10 раз.

2. Подготовка к регистрации **одновременно** исследуемого опытного образца от больного животного или опытного образца, подвергнутого тому или иному воздействию, и контрольного — от здорового животного, или без воздействия.

3. Толщина объекта — сыворотки, суспензии клеток, мочи ... — не менее 0,5 см и не более 2 см.

4. Перед измерением все образцы выдержать в темноте не менее 10 мин для исключения послесвечения. Для стабилизации температуры образцы до измерения выдержать при температуре измерения не менее 10 мин.

5. Температура измерения устанавливается в соответствии с целями эксперимента.

6. Оптимальным является время одного определения свечения 10 с, время измерения — 100 с, т. е. 10 определений по 10 с.

7. Схема последовательности измерения следующая:

1	фон,	пустая кювета	стандарт	контроль	образец
2	фон	пустая кювета	стандарт	контроль	образец
...					
10	фон	пустая кювета	стандарт	контроль	образец
		Среднее	значение		

Многократное повторение измерений фона, стандарта и контроля является обязательным общим условием при измерении сверхслабых световых сигналов.

1.2. Чувствительность и рабочие характеристики биохемилюминометров

В связи с выявлением широких прикладных возможностей биохемилюминесценции с годами количество работ, посвященных изучению этого явления, резко возрастает [24, 199]. Во многих научных центрах страны (в Москве, Горьком, Киеве, Риге и др.) и за рубежом (LMB Wallas 1251, Berthold Biolumat LB 9500 и др.) разработаны и серийно выпущены разные приборы: у нас — лабораторные хемилюминометры (ХЛМ), за рубежом — промышленные модели биохемилюминометров. В нашей стране для широкого, коммерческого серийного производства они еще не рекомендованы, в связи с чем значительная часть приборов изготавливается индивидуально-кустарным способом и малыми партиями.

В этих условиях сравнительные исследования рабочих характеристик наших современных лабораторных и промышленных импортных ХЛМ являются весьма актуальными: результаты подобных работ

[...]