

ЕОУ 2
Б 24
АКАДЕМИЯ НАУК СССР

Г. М. БАРЕНБОЙМ
А. Н. ДОМАНСКИЙ
К. К. ТУРОВЕРОВ

ЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ



БИОПОЛИМЕРОВ

И КЛЕТОК



АКАДЕМИЯ НАУК СССР
ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ

Г. М. БАРЕНБОЙМ
А. Н. ДОМАНСКИЙ
К. К. ТУРОВЕРОВ

ЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ БИОПОЛИМЕРОВ И КЛЕТОК



ИЗДАТЕЛЬСТВО «НАУКА»
МОСКВА · ЛЕНИНГРАД
1966

УДК 612.014.445

Ответственный редактор
член-корреспондент АН СССР
М. В. Волькенштейн

2-10-2
1011-66

ОТ РЕДАКТОРА

Развитие таких актуальных областей современного естествознания, как молекулярная биология и цитология, тесно связано с широким применением оптических и спектральных методов для изучения биологических объектов. Ценнейшая информация о структуре и свойствах биополимеров получается при изучении ультрафиолетовых и инфракрасных спектров поглощения, а также при исследовании оптической активности и других оптических явлений. По-видимому, весьма обещающими являются и исследования магнитного вращения плоскости поляризации.

Очень большое число работ посвящено изучению люминесценции биологически-функциональных молекул, клеток и их органоидов, тканей и организмов в целом. Накоплен богатый материал, в котором не так-то легко разобраться. Авторы этой книги приняли эффективное участие в изучении люминесценции биологических объектов. Книга представляет собой попытку систематизировать данные, имеющиеся в литературе, в том числе полученные и самими авторами. В ней подводятся итоги многочисленных работ и демонстрируются те возможности решения важных для биологии вопросов, которые дает люминесценция. Книга рассчитана прежде всего на экспериментаторов: биофизиков, биохимиков, цитологов. Поэтому наряду с подробным и критическим обзором экспериментальных данных по люминесценции аминокислот, белков, нуклеотидов, нуклеиновых кислот и клеток в последних главах книги содержится детальное описание аппаратуры и методических приемов. Напротив, сравнительно мало внимания уделено теоретическим вопросам, квантово-механической интерпретации спектров люминесценции. Но с этими вопросами читатель может познакомиться в ряде монографий, а экспериментальная сводка такого рода до сих пор в литературе отсутствовала.

Авторы книги разработали ряд экспериментальных установок для исследования люминесценции биологических объектов и дади

их теоретическое обоснование. Поэтому две последние главы книги представляют особую ценность: значительная часть содержащегося в них материала публикуется впервые.

Содержание книги не исчерпывает применений люминесценции в биохимии и биофизике. Авторы сознательно ограничились перечисленными выше объектами. Они не затрагивают люминесценцию коферментов и простетических групп, изучение которой в ряде случаев дает полезные сведения о природе ферментативной активности. Не рассмотрена люминесценция некоторых других типов биологически функциональных веществ, свечение люминофоров, адсорбированных на биополимерах, с помощью которого удастся получать информацию о конформационных свойствах белков и нуклеиновых кислот. Тем не менее содержащийся в книге материал очень ценен и, я думаю, что книгой будут широко пользоваться.

В двух случаях изучение люминесценции биологических систем вызывало появление гипотез, претендующих на большую значимость. Это, во-первых, работы по митогенетическим лучам Гурвича и его школы и, во-вторых, работы Сент-Дьердьи и его последователей, посвященные роли триплетных состояний в биологических системах. Сейчас мы знаем, что оба направления привели пока лишь к весьма спорным результатам, не оказавшим решительного влияния на блистательное развитие молекулярной биологии и цитологии в последние десятилетия. Освещая эти проблемы, авторы книги проявляют необходимую осторожность. Они совершенно правильно уделяют основное внимание люминесценции вполне определенных объектов — молекул и клеточных органоидов, почти не касаясь многочисленных работ, посвященных люминесценции гомогенатов различных тканей, т. е. весьма неопределенных и сложных систем, с трудом поддающихся научному анализу.

Мне представляется, что монография Баренбойма, Доманского и Туроверова будет очень полезна для биофизиков, биохимиков и цитологов. Залогом этого является высокая квалификация авторов, осторожность и добросовестность, проявленные ими при изложении материала.

М. Волькенштейн

ПРЕДИСЛОВИЕ

Люминесцентный анализ белков, клеток и в меньшей степени нуклеиновых кислот получил за последнее десятилетие большое распространение. Три причины стимулировали это распространение: смелые гипотезы Сент-Дьердьи о роли возбужденных электронных состояний, удачное приложение люминесцентного анализа к количественному определению аминокислот, белков, пуринов и пиримидинов и, наконец, выявившаяся взаимосвязь между физиологическим состоянием клетки и ее люминесценцией.

Накопившийся материал по люминесценции биологических объектов и успехи структурной химии биополимеров дали в последние два-три года толчок новому направлению люминесцентного анализа — изучению конформационных переходов в биополимерах. Выяснилось, что изменения люминесценции — чувствительный критерий конформационных переходов и что в некоторых случаях изменения люминесценции лучше коррелируют с биологической активностью, чем другие физико-химические характеристики. За короткий срок появилось большое число работ, посвященных этому аспекту приложения люминесценции. Почти одновременно в различных работах было показано, что люминесценция клеток обусловлена клеточным белком. Это еще больше повысило интерес к изучению связи структуры белка с люминесценцией.

До сих пор, говоря о люминесценции, мы имели в виду только люминесценцию, возбуждаемую светом. Однако фотолюминесценция тесно связана с люминесценцией биополимеров, возбуждаемой ионизирующим излучением, и с хемилюминесценцией живых организмов и клеток, возникающей в ходе экзотермических реакций. Во-первых, эта связь определяется самим физическим процессом излучения: возбужденная молекула биополимера не «помнит» своей «предыстории», и конечный процесс излучения один для всех явлений. Во-вторых, эта связь биохимическая: например, в некоторых случаях при фото-, радио- и хемилюминесценции одного и того же объекта ответственной за свечение может

быть белковая молекула. Кроме того, исследование этих явлений связано методически: аппаратура и проблемы, которые приходится решать при ее создании, примерно одинаковы для всех видов люминесценции биологических объектов. Таким образом, изучение различных видов люминесценции оказывается органически связанным между собой.

Быстрое и взаимосвязанное развитие самых различных направлений исследования люминесценции биологических объектов вызвало к жизни большое число работ, которые еще не нашли своего обобщения. Единственная монография Юденфренда * посвящена только фотолюминесценции, не затрагивает люминесценцию нуклеиновых кислот и клеток и не отражает работ того направления, которое посвящено связи люминесценции и структуры биополимеров. Поэтому авторы этой книги поставили задачу рассмотреть как имеющиеся в литературе, так и оригинальные данные и, опираясь на эти сведения, ответить на вопрос: какую информацию может дать изучение люминесценции биополимеров и клеток. Такой вопрос вправе задать каждый исследователь, обращающийся к этому сравнительно новому для биологии методу.

Если те сведения, которые можно получить сегодня при изучении люминесценции биополимеров и клеток, представят интерес для читателя, то в двух заключительных главах он сможет найти описание тех приемов и установок, которые позволяют получить подобную информацию.

Введение написано авторами совместно с Г. И. Кобыпевым, глава о хемилюминесценции клеток совместно с И. П. Новиковым, разделы 5.4 и 6.2 совместно с Ю. М. Розановым. В книгу вошли оригинальные фотографии флуоресцирующих клеток, любезно предоставленные Н. А. Черноградской, а также некоторые данные из работ А. Плученничака, В. Ф. Соломатина и М. Янгисбаева, выполненные в нашей лаборатории. Всем этим товарищам авторы приносят глубокую благодарность.

Авторы сердечно благодарят академика А. Н. Теренина и докт. техн. наук Е. М. Брумберга, вниманием которых они пользовались во все время работы, а также Е. В. Ануфриеву, сделавшую при просмотре рукописи ряд ценных замечаний.

* S. U d e n f r i e n d. 1962. Fluorescence assay in biology and medicine. N. Y.—London.

ОСНОВНЫЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ ЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ РАСТВОРОВ МНОГОАТОМНЫХ ОРГАНИЧЕСКИХ МОЛЕКУЛ

Изложению физических основ люминесценции посвящена обширная литература. По возрастающей сложности можно указать на частично или полностью посвященные основам люминесценции книги Константиновой-Шлезингер (1961), Юденфренда (Udenfriend, 1962), Веста (West, 1956), Теренина (1947), Левшина (1951), Прингсгейма (Pringsheim, 1949), Ельяшевича (1962), Волькенштейна (1955), Степанова (1955), Степанова и Грибковского (1963). Основные понятия и закономерности люминесценции сложных молекул, знание которых необходимо при чтении этой книги, изложены в предлагаемом читателю введении. Основой для изложения послужили частично монографии, названные выше, а также работы последних лет, в основном обзорные, посвященные люминесценции сложных, прежде всего гетероатомных молекул.

0.1. ЭЛЕКТРОННО-КОЛЕБАТЕЛЬНЫЕ СПЕКТРЫ МОЛЕКУЛ И ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ ЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ

Энергия молекулы E складывается из кинетической энергии ее движения $E_{\text{кин}}$, энергии движения электронов $E_{\text{эл}}$, колебания ядер $E_{\text{кол}}$ и вращения молекулы как целого $E_{\text{вр}}$:

$$E = E_{\text{кин}} + E_{\text{эл}} + E_{\text{кол}} + E_{\text{вр}}. \quad (0.1)$$

Формула 0.1 верна лишь в первом приближении, так как она не учитывает взаимного влияния всех трех видов внутреннего движения, которое особенно существенно для сложных молекул. Однако применение формулы (0.1) позволяет строить энергетические диаграммы, на которых каждому электронному состоянию соответствует энергетический уровень (терм); при этом каждый электронный уровень имеет несколько колебательных подуровней, а каждый колебательный — набор вращательных (рис. 0.1).

Наименьшее из возможных значений электронной энергии (E_0 на рис. 0.1) соответствует основному (невозбужденному)

состоянию молекулы. Электронные состояния с большим запасом энергии ($E_1, E_2 \dots, E_n$) называют возбужденными.

Если частота (ν) падающего на молекулу кванта света удовлетворяет уравнению:

$$h\nu = E_1 - E_0 = \Delta E, \quad (0.2)$$

где $h = 6.625 \cdot 10^{-27}$ эрг · сек. — постоянная Планка, то молекула может поглотить квант $h\nu$, переходя при этом с уровня E_0 на

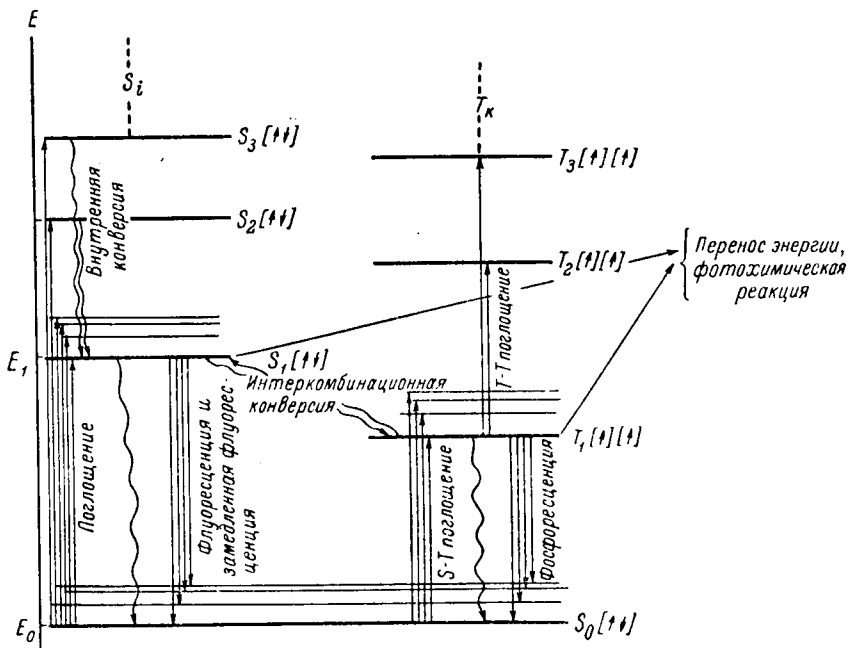


Рис. 0.1. Энергетические уровни молекулы и переходы между ними.

По оси ординат — энергия (E) уровней. S_0 — основное состояние, $S_1, S_2 \dots, S_i \dots$ и $T_1, T_2 \dots, T_K \dots$ — синглетные и триплетные уровни соответственно. Жирные горизонтальные линии — электронные уровни, тонкие горизонтальные линии — колебательные подуровни. Вертикальными линиями обозначены различные переходы между электронными уровнями, сопровождающиеся поглощением или испусканием света. Волнистые линии — безызлучательные переходы. В квадратных скобках показана схематически ориентация спинов электронов внешних орбит молекулы в соответствующих электронных состояниях.

уровень E_1 (часто говорят о переходе электрона в молекуле, так как переход молекулы из одного электронного состояния в другое связан с изменением конфигурации ее электронного облака).

Обратный переход молекулы с уровня E_1 на уровень E_0 может сопровождаться излучением фотона $h\nu$ (люминесценцией).*

* Молекула может перейти в возбужденное состояние не только в результате поглощения кванта света, но также в ходе химической реакции или

В зависимости от природы возбужденного состояния и характера перехода к основному состоянию люминесценция делится на флуоресценцию и фосфоресценцию, различия между которыми более подробно рассмотрены в разделе 0.2. Возвращение к основному состоянию после возбуждения происходит через очень малый, но измеримый отрезок времени; для многих органических молекул в растворах не менее чем через 10^{-8} — 10^{-9} сек. (флуоресценция), что значительно превышает период световых колебаний. Это является наиболее характерным признаком люминесценции, отличающим ее от релеевского и комбинационного рассеяния, свечения Вавилова—Черенкова, преломления и отражения света и т. п., не связанных с переходом молекул в стационарное возбужденное состояние и исчезающих практически за время, соизмеримое с периодом возбуждающих колебаний (10^{-14} сек.) (Вавилов, 1950; Степанов, 1955).

Поток света люминесценции можно характеризовать его интегральной интенсивностью и спектральным составом. Зависимость интенсивности свечения I от длины волны λ называется спектром излучения (спектром люминесценции).

Спектр флуоресценции всегда смещен в сторону больших длин волн по сравнению со спектром поглощения (закон Стокса). Однако длинноволновая область спектра поглощения и коротковолновая область спектра флуоресценции частично перекрываются, что особенно характерно для сложных молекул. Флуоресценция с длиной волны, меньшей длины волны возбуждающего света, называется антистоксовой. Дополнительная энергия, необходимая для ее возникновения, обеспечивается возбуждением молекул с повышенным запасом колебательной энергии.

Зависимость интегральной интенсивности люминесценции или ее интенсивности при выбранной длине волны от длины волны возбуждающего света называется спектром возбуждения (спектром действия) люминесценции. Отношение числа излученных квантов к числу поглощенных называется квантовым выходом q . Экспериментально показано, что у ряда веществ в широком интервале длин волн возбуждающего света квантовый выход флуоресценции не меняется, что обычно называют законом Вавилова.

В общем случае при электронном переходе будет меняться также колебательная $E_{\text{кол}}$ и вращательная $E_{\text{вр}}$ энергия молекулы. Поэтому электронный спектр в действительности является электронно-колебательно-вращательным спектром (упрощенно, электронный или электронно-колебательный). Так как энергетические уровни имеют конечную ширину и в сложных молекулах

под воздействием излучения радиоактивного источника, рентгеновского излучения и т. д. В зависимости от вида возбуждения люминесценцию делят на фото-, хими-, радиолюминесценцию и т. д. Во введении рассматривается лишь люминесценция, возбуждаемая светом.

перекрываются друг с другом, образуя непрерывную последовательность, контур электронных спектров сложных молекул практически лишен колебательной структуры. Форма полос поглощения и испускания определяется вероятностями перехода между различными колебательными уровнями основного и возбужденного состояний и функцией распределения колебательных уровней по энергиям верхнего и нижнего электронных состояний для поглощения и испускания соответственно.

Э ф ф е к т Ш п о л ь с к о г о. Отсутствие четко выраженной колебательной структуры в электронно-колебательных спектрах сложных молекул является серьезным препятствием при практическом использовании молекулярной спектроскопии. Поэтому все время делались попытки найти условия, которые бы обеспечивали выявление колебательной структуры спектров.

Можно уменьшить число практически реализуемых степеней свободы молекулы, заморозив раствор. Однако растворы многих органических веществ в замороженном состоянии образуют молекулярные кристаллы, при поглощении света которыми возникает ряд специфических эффектов, приводящих к уширению спектральной полосы излучения.

Межмолекулярное взаимодействие можно практически полностью исключить, переведя исследуемое вещество в разреженный газ (пар). Однако в этом состоянии реализуется большой набор колебательных и вращательных состояний, причем последние в газах образуют почти непрерывную последовательность, что приводит к размытию структуры спектра. Кроме того, лишь немногие вещества сложного строения могут быть переведены в газовую фазу без разложения.

Оказалось возможным соединить преимущества, даваемые глубоким охлаждением и переводом веществ в парообразное состояние, и в то же время избавиться от осложнений, вносимых в спектры особенностями этих фазовых состояний. Такие условия для получения близких к линейчатым электронопо-колебательных спектров многоатомных органических молекул возникают при помещении их в другое вещество — матрицу, обеспечивающую изоляцию молекул друг от друга и после замораживания фиксации их в строго определенном ориентированном положении. Молекулы в матрице находятся в виде «ориентированного газа».

Шпольский и сотрудники (Шпольский и Ильина, 1951; Шпольский и др., 1952) впервые обнаружили, что в спектрах люминесценции замороженных растворов полиаценов, полиенов, полифенилов и нормальных парафинах как матрицах проявляется квазилинейчатый характер колебательной структуры электронных переходов. Это явление получило название эффекта Шпольского.

Согласно представлениям, развиваемым Шпольским (1959, 1960, 1962, 1963), парафиновые матрицы дают возможность получать исследуемое вещество (активатор) в молекулярно-дисперги-

рованном состоянии, благодаря геометрическому подобию форм матрицы и активатора.

Для того чтобы излучающие молекулы образовали «ориентированный газ», матрица должна включать их без деформации, но достаточно жестко; не взаимодействуя с люминесцирующими молекулами, она должна образовывать с ними однородный твердый раствор, и, наконец, матрица должна быть прозрачна во всей области возбуждения и излучения люминесцирующих молекул.

При использовании в качестве матриц *n*-парафинов квазилинейчатые спектры обнаружены у широкого круга веществ, в частности у гетероциклических соединений (см., например, Пурмухамедов и др., 1960; Шигорин и др., 1962), для некоторых пигментов биологического происхождения (например, для порфиринов; Литвин и Персонов, 1961; Севченко и др., 1963) и их аналогов (Литвин и Персонов, 1961; Лялип и Кобышев, 1963). Однако получить квазилинейчатые спектры белков, нуклеиновых кислот или их составляющих пока не удалось,* хотя обнаружение квазилинейчатого спектра явилось бы своеобразным индикатором стереосоответствия матрицы и включенной молекулы, последнее же имеет существенное значение для ряда аспектов молекулярной биологии (Волькенштейн, 1965).

Следует отметить, что, кроме нормальных углеводов, в качестве матрицы могут быть использованы и другие растворители, например, дибензиламиноэтанол (Вальдман и Шереметьев, 1963), циклогексан (Kanda a. Shimada, 1961) и бензол (Kanda et al., 1963).

Многочисленные использования эффекта Шпольского в количественном и качественном анализе, при изучении строения многоатомных органических молекул в кристаллохимии и физике твердого тела рассмотрены в уже названных обзорах и в более популярных обзорах Шпольского (1965а, 1965б).

Влияние растворителя на электронные спектры молекул. На основные характеристики люминесценции — интенсивность, квантовый выход и спектры — влияют различные факторы среды. Влияние некоторых из них на те или иные характеристики будет частично рассмотрено в последующих параграфах. Здесь мы кратко остановимся лишь на влиянии растворителя на положение спектров, что представляет значительный интерес для изложения основного материала книги (1.4).

Непорент и Бахшиев (1960) предложили подразделять межмолекулярные взаимодействия, приводящие к смещению электронных спектров в растворах, на универсальные, обусловленные коллективным влиянием на молекулу растворенного вещества сово-

* О работе Бобровица и Конева (1964), в которой наблюдался структурированный спектр люминесценции кристаллической амилазы, см. на стр. 46.

купности окружающих ее молекул растворителя, и специфические, обусловленные взаимодействием растворенной молекулы с одной или несколькими из окружающих молекул растворителя за счет донорно-акцепторного взаимодействия, ассоциации, образования водородных связей и т. п.

Теория влияния универсальных взаимодействий на положение электронных спектров молекул (Бахшиев, 1961, 1964) позволяет связать величину смещения спектров с макроскопическими характеристиками растворителя — показателем преломления и диэлектрической постоянной — и свойствами раство-

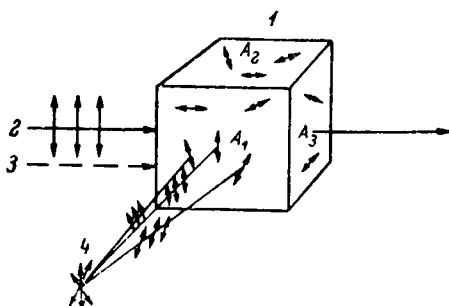


Рис. 0.2. Возникновение поляризованной люминесценции.

1 — кювета с раствором, 2 — линейно-поляризованный возбуждающий свет, 3 — естественный возбуждающий свет, 4 — частично поляризованная люминесценция.

ренной молекулы — ее объемом и соотношением дипольных моментов в основном и возбужденном состояниях. В растворе молекула, обладающая дипольным моментом $\vec{\mu}_i$ (постоянным или наведенным), взаимодействует с внутренним электрическим полем F_i , создаваемым всей совокупностью окружающих ее молекул растворителя, что приводит к изменению энергетического положения ее электронных уровней на величину энергии взаимодействия

$$W_i = -\vec{\mu}_i F_i, \quad (0.3)$$

где i обозначает различные состояния молекулы. Разность энергий взаимодействия ΔW в основном и возбужденном состоянии определяет величину смещения спектров поглощения и флуоресценции соответственно. В общем случае величина этого смещения для спектров поглощения может отличаться от аналогичной величины для спектров флуоресценции.

Поляризация люминесценции. Для того чтобы молекула поглощала энергию световой волны, недостаточно выполнения условия (0.2). Необходимо также, чтобы электрический вектор световой волны имел составляющую, параллельную осциллятору поглощения.

В эксперименте мы имеем дело не с отдельной молекулой, а с огромным числом молекул. Так как в растворе молекулы не ориентированы, то поглощение света не будет зависеть от состояния его поляризации. Однако в этом случае даже при возбуждении естественным (неполяризованным) светом можно наблюдать поляризованную люминесценцию (спонтанная поляризация). При этом наибольшая поляризация люминесценции наблюдается под углом

90° к направлению распространения возбуждающего света, так как молекулы, осцилляторы которых расположены параллельно распространению возбуждающего пучка (A_2 на рис. 0.2), не поглощают свет. При наблюдении вдоль направления распространения возбуждающего света спонтанная поляризация отсутствует.

Наряду со спонтанной поляризацией можно изучать поляризацию люминесценции при возбуждении плоско-поляризованным светом. При этом поляризованную люминесценцию можно наблюдать и в направлении распространения возбуждающего света. Дополнительные сведения о пространственном расположении осцилляторов может дать изучение поляризации люминесценции ориентированных молекул (например, в растянутых пленках) при возбуждении плоскополяризованным светом.

За количественную меру поляризации принимается величина, называемая степенью поляризации:

$$P = \frac{I_1 - I_2}{I_1 + I_2}, \quad (0.4)$$

где I_1 и I_2 — интенсивности световых потоков, составляющих излучение люминесценции, поляризованных взаимно перпендикулярно. Степень поляризации люминесценции зависит от взаимной ориентации поглощающего и излучающего осцилляторов молекулы. Ввиду того, что излучение происходит обычно с одного возбужденного уровня, соблюдается постоянство степени поляризации по всему спектру люминесценции.

Зависимость степени поляризации от длины волны возбуждающего света называется поляризационным спектром (по поглощению). Если возбуждение молекулы связано с одним электронным переходом, степень поляризации не будет зависеть от длины волны возбуждающего света. При участии в поглощении нескольких осцилляторов анализ поляризационных спектров и сопоставление их со спектрами поглощения позволяет делать выводы об относительной ориентации осцилляторов поглощения и излучения. Такой анализ позволяет показать участие в спектре поглощения нескольких электронных переходов. Часто поляризационные спектры оказываются более специфичными для данного вещества, чем спектр его флуоресценции.

Абсолютная величина поляризации уменьшается вследствие броуновского вращения молекул. Связь между степенью поляризации, свойствами люминесцирующих молекул и свойствами среды устанавливает формула Перрена:

$$\frac{1}{P} = \frac{1}{P_0} + \left(\frac{1}{P_0} - \frac{1}{3} \right) \tau \frac{RT}{V\tau_1}, \quad (0.5)$$

где R — газовая постоянная, T — абсолютная температура,

η — вязкость среды, V — молекулярный объем люминесцирующих молекул, τ — время жизни возбужденного состояния, P_0 — предельное значение поляризации, соответствующее $T/\eta \rightarrow 0$. Уравнение (0.5) позволяет определить время жизни возбужденного состояния, если известен молекулярный объем люминесцирующей молекулы и, наоборот.

Более подробные сведения о поляризации люминесценции можно найти в обзоре и монографии Феофилова (1948, 1959).

0.2. ОПТИЧЕСКИЕ ПЕРЕХОДЫ МЕЖДУ СИНГЛЕТНЫМИ И ТРИПЛЕТНЫМИ УРОВНЯМИ

Представление о вращении электрона вокруг собственной оси приводит к понятию спинового углового момента (или просто спина), который в зависимости от направления вращения может принимать два значения: $\pm \frac{1}{2} \frac{h}{2\pi}$. Согласно принципу Паули, на одной орбите может находиться не более двух электронов, при этом их спины направлены в противоположные стороны (имеют противоположные знаки). Если в молекуле все спины электронов попарно противоположно направлены (антипараллельны), то результирующий спин электронов S равен нулю. Если один из электронов меняет направление вращения вокруг собственной оси на противоположное (переориентация спина), то суммарный спин становится равным единице.

Величина $2S+1$ определяет кратность (мультиплетность) уровня — число возможных ориентаций электронного спина относительно их суммарного орбитального момента. Если $S=0$, то $2S+1=1$ и соответствующий энергетический уровень называется синглетным, если $S=1$, то $2S+1=3$ и энергетический уровень называется триплетным. Обычно основное (невозбужденное) состояние молекулы — синглетное. Изменение направления спина одного из электронов, в соответствии с принципом Паули, сопровождается перемещением одного из них на другую орбиту — молекула переходит на триплетный уровень. Появление в молекуле двух неспаренных электронов в триплетном состоянии придает ей свойства химически активного бирадикала (Теренин, 1947).

Для удобства дальнейшего изложения введем следующие обозначения энергетических уровней молекулы: S_i — синглетные, T_k — триплетные; индексы $i=0, 1, 2, 3, \dots$ и $k=1, 2, 3, \dots$ означают порядковый номер уровня данной мультиплетности.* Переходы между электронными уровнями на основе квантово-механических правил отбора делят на разрешенные и запрещенные (интеркомбинационные). К разрешенным относятся переходы, идущие без изменения мультиплетности ($S_0 \leftrightarrow S_1$, $T_1 \leftrightarrow T_2$ на

* Состояние T_1 можно рассматривать как основное состояние молекулы с измененным спином.

рис. 0.1), к запрещенным — с изменением мультиплетности ($S_0 \leftrightarrow T_1$, $S_1 \leftrightarrow T_1$).

Синглет-синглетные переходы легко обнаруживаются как при поглощении, так и при излучении света. Излучение, возникающее при переходе молекулы из возбужденного синглетного в основное синглетное состояние, получило название флуоресценции. В растворах излучательные переходы обычно происходят с самых нижних возбужденных синглетных или триплетных уровней, даже если возбуждены более высокие электронные уровни. Эту закономерность часто называют в литературе правилом Каша (Kasha, 1950).*

Триплет-триплетные переходы обнаружены при поглощении света у значительного числа различных молекул (см., например, обзор: McClure, 1951). Однако триплет-триплетная флуоресценция обнаружена лишь в растворах трифенилена (Dupaу et al., 1963). Время жизни молекулы на уровне T_2 сравнимо с временем жизни на первом синглетном возбужденном уровне S_1 .

Синглет-триплетные переходы в растворах многоатомных органических молекул обнаружены как при поглощении света (см., например, обзор: West, 1956), так и при излучении (см. обзор: Parker, 1964). Излучение при $T_1 \rightarrow S_0$ -переходе получило название фосфоресценции.

Оптические переходы между термами разной мультиплетности для дипольного излучения запрещены (запрет интеркомбинации). Время жизни молекулы в триплетном состоянии для триплет-синглетных переходов, вследствие запрета перехода, значительно превышает времена жизни молекулы в возбужденных состояниях, переход с которых разрешен.

Несмотря на запрет, переходы $S_0 \rightarrow T_1$ происходят вследствие того, что в результате спин-орбитального взаимодействия уровень T_1 не является чисто триплетным, а представляет собой суперпозицию триплетного и синглетного состояний.

Спин-орбитальное взаимодействие увеличивается с возрастанием атомного номера элементов, входящих в хромофорную группу. Одновременно возрастает вероятность $T_1 \rightarrow S_0$ -переходов: для некоторых рядов соединений вероятность осуществления фосфоресцентного перехода приблизительно пропорциональна квадрату величины спин-орбитального взаимодействия. Этот эффект четко прослеживается при введении в молекулу заместителей — тяжелых атомов, в частности галогенов (см. обзоры: West, 1956; McGlynn et al., 1964). Усиление спин-орбитального взаимодействия, на-

* Известны исключения из этого правила. Так, например, для азулена и дифенилена, у которых отсутствует излучение с уровня S_1 , обнаружено излучение с уровня S_2 (см. обзор: McGlynn et al., 1964). Излучение с уровня S_2 наряду с основным испусканием с уровня S_1 было обнаружено Терениным, Лялиным и Кобышевым в молекуле хлорофилла при возбуждении мощным излучением рубинового лазера.

пример, парамагнитными молекулами O_2 или NO также увеличивает вероятность синглет-триплетных переходов (см. обзоры: Теренин, 1947; Карякин, 1961; Баренбойм, 1963).

Несмотря на то, что ряд веществ способен увеличивать вероятность $S_0 \leftrightarrow T_1$ -перехода, она остается в общем мала по сравнению с вероятностью разрешенных переходов. Тем не менее путем внутренней интеркомбинационной конверсии происходит интенсивное заселение триплетного уровня T_1 через уровень S_1 (рис. 0.1).*

Высокая заселенность долгоживущего уровня T_1 (большое число молекул, находящихся в этом состоянии) наряду с тем, что флюоресценция длится в то время как флуоресценция уже полностью затухает, причем спектры их различаются, делает методически удобным изучение $S_0 \leftrightarrow T_1$ -переходов по флюоресценции.

Излучение синглетного возбужденного уровня, на который молекула переходит после пребывания в триплетном состоянии ($T_1 \dots \rightarrow S_1 \rightarrow S_0$), получило название замедленной флуоресценции. Это свечение спектрально совпадает с флуоресценцией, но отличается от нее по времени затухания. Подробные сведения о замедленной флуоресценции можно найти в обзоре Паркера (Parker, 1964). На основе этого обзора ниже изложены основные сведения о замедленной флуоресценции.

В зависимости от механизма $T_1 \dots \rightarrow S_1$ -перехода, предшествующего излучению, замедленную флуоресценцию можно разделить на два типа. В первом из них переход $T_1 \dots \rightarrow S_1$ осуществляется за счет термической активации интеркомбинационного процесса $T_1 \sim S_1$. В соответствии с этим интенсивность свечения этого типа определяется выражением

$$I = Ae^{-\frac{E}{kT}}, \quad (0.6)$$

где T — абсолютная температура, k — постоянная Больцмана, E — энергия активации, необходимая для перевода молекулы из триплетного в возбужденное синглетное состояние.

Так как интенсивность этого свечения зависит от заселенности триплетного уровня, то она пропорциональна первой степени интенсивности возбуждающего света (мономолекулярный процесс). Время затухания замедленной флуоресценции этого типа равно, в идентичных условиях, времени затухания фосфоресценции. В литературе иногда этот тип свечения называют α -фосфоресценцией (Pringsheim, 1949).

* Уровни S_1 и T_1 — также разной мультиплетности, однако по ряду квантово-механических причин, частично обсуждаемых в обзоре Мак-Глинна и др. (McGlynn et al., 1964), константы скорости интеркомбинационной конверсии $S_1 \leftrightarrow T_1$ много больше константы скорости электронного перехода $S_0 \rightarrow T_1$.

Второй тип замедленной флуоресценции возникает за счет так называемой триплет-триплетной аннигиляции, суть которой состоит в том, что при столкновении двух однотипных молекул в триплетном состоянии между ними происходит обмен энергии, в результате чего одна молекула переходит в возбужденное синглетное, а другая — в основное состояние. Теоретические основы триплет-триплетной аннигиляции изложены в работе Штернлихта и др. (Sternlicht et al., 1963). При триплет-триплетной аннигиляции возможно образование триплетных димеров и эксимеров — комплексов возбужденной молекулы с молекулой в основном состоянии (Parker, 1964).

Так как триплет-триплетная аннигиляция — бимолекулярный процесс, интенсивность замедленной флуоресценции в этом случае пропорциональна квадрату интенсивности возбуждающего света. По этой же причине интенсивность убывает с уменьшением концентрации и с увеличением вязкости среды.

Наряду с названными типами замедленной флуоресценции этим термином иногда также называют свечение, возникающее в рекомбинационных процессах, следующих за ионизацией молекулы, о чем несколько подробнее сказано в гл. 3 (стр. 101).

0.3. ОСОБЕННОСТИ ЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ ГЕТЕРОАТОМНЫХ МОЛЕКУЛ

Электроны внешних оболочек, обуславливающие оптические свойства молекулы, делят на три типа: σ -электроны, образующие одинарную связь; π -электроны, образующие вместе с σ -электронами двойную или тройную связь; n -электроны — электроны неподеленных пар гетероатомов (N, O, S, P и т. д.), которые могут участвовать в донорно-акцепторном взаимодействии.

Переход молекулы из одного электронного состояния в другое связан с изменением конфигурации ее электронных облаков. Это изменение может затрагивать различные электроны в молекуле. Если в процессе возбуждения молекулы происходит перераспределение облаков π -электронов, то осуществляется $\pi^* \leftarrow \pi$ -переход. При наличии в молекуле гетероатомов возможен переход n -электрона с несвязывающей орбиты, локализованной на одном из гетероатомов, на разрыхляющую π^* -орбиту ($\pi^* \leftarrow n$ -переходы; Kasha, 1950; Rao, 1961) и т. д.

Соответствующие рассмотренным переходам возбужденные электронные состояния называют $\pi\pi^*$ - и $n\pi^*$ -состояниями. Классификацию спектров поглощения по принадлежности полос к тем или иным электронным переходам для отдельных классов химических соединений можно найти, например, в книге Рао (Rao, 1961). Полосы поглощения, соответствующие $\pi^* \leftarrow \pi$ - и $\pi^* \leftarrow n$ -переходам, часто спектрально перекрываются. Полосы поглощения ~~разрешенных $\pi^* \leftarrow n$ -переходов~~ характеризуются значительно

более низким молярным коэффициентом поглощения ($\epsilon=300-2000$) по сравнению со значениями для разрешенных $\pi^* \leftarrow \pi$ -переходов ($\epsilon=10^4-10^5$) (Kasha, 1961).

Осцилляторы синглетных $\pi^* \leftarrow \pi$ -переходов лежат в плоскости ароматических колец, в то время как осцилляторы триплетных $\pi^* \leftarrow \pi$ -переходов перпендикулярны плоскости колец. Осцилляторы $\pi^* \leftarrow n$ -синглетных переходов перпендикулярны плоскости колец, а триплетных — лежат в их плоскости (Kasha, 1961).

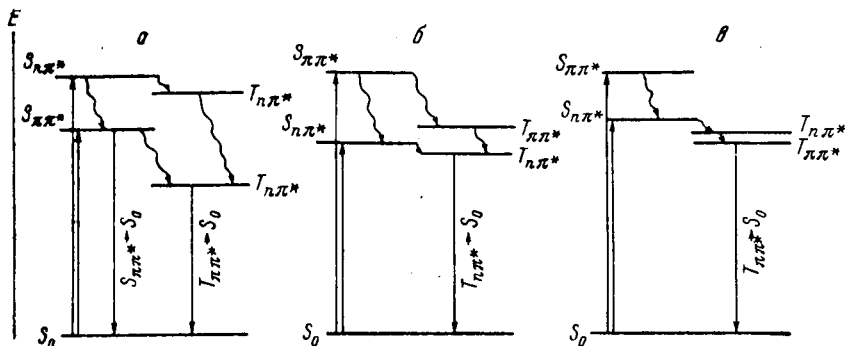


Рис. 0.3. Возможные варианты относительного расположения нижних возбужденных $\pi\pi^*$ - и $n\pi^*$ -уровней гетероатомных молекул.

S_0 — основное состояние; $S_{\pi\pi^*}$, $S_{n\pi^*}$, $T_{\pi\pi^*}$, $T_{n\pi^*}$ — нижние возбужденные синглетные и триплетные уровни $\pi\pi^*$ - и $n\pi^*$ -типа. E — энергия состояния. а — $E(S_{\pi\pi^*}) < E(S_{n\pi^*})$; б — $E(S_{\pi\pi^*}) > E(S_{n\pi^*})$, $E(T_{\pi\pi^*}) > E(T_{n\pi^*})$; в — $E(S_{\pi\pi^*}) > E(S_{n\pi^*})$, $E(T_{\pi\pi^*}) < E(T_{n\pi^*})$.

Необходимым (но недостаточным) условием существования $\pi^* \leftarrow n$ -полосы в спектре поглощения является наличие свободной пары электронов (n -электронов) гетероатома, связанного π -связью с другим атомом в молекуле. Отсюда одним из критериев принадлежности полосы поглощения к $\pi^* \leftarrow n$ -переходу в гетероатомной молекуле может являться отсутствие этой полосы в спектре поглощения углеводородного аналога рассматриваемого гетероатомного соединения (Kasha, 1961).

Рассмотрим люминесцентные свойства гетероатомных молекул при различном относительном положении нижних синглетных $\pi\pi^*$ - и $n\pi^*$ -уровней (рис. 0.3).

1. Нижний синглетный $\pi\pi^*$ -уровень энергетически ниже нижнего синглетного $n\pi^*$ -уровня. В рассматриваемом случае люминесцентные свойства гетероатомной молекулы фактически сходны с люминесцентными свойствами многоатомной молекулы, не содержащей гетероатомов. Вне зависимости от того, происходит ли возбуждение молекулы в ее длинноволновой $\pi^* \leftarrow \pi$ - или $\pi^* \leftarrow n$ -полосах поглощения, наблюдается $S_{\pi\pi^*} \rightarrow S_0$ -флуоресценция и $T_{\pi\pi^*} \rightarrow S_0$ -фосфоресценция.

2. Нижний синглетный $\pi\pi^*$ -уровень энергетически выше нижнего синглетного $\pi\pi^*$ -уровня. В этом случае молекула, как правило, не флуоресцирует¹ (Kasha, 1950, 1960), что объясняется малой вероятностью оптического перехода $S_{\pi\pi^*} \rightarrow S_0$ и большой вероятностью интеркомбинационной конверсии к триплетным уровням. В зависимости от конкретных свойств молекулы и условий среды могут иметь место два варианта относительного энергетического положения триплетных $\pi\pi^*$ - и $\pi\pi^*$ -уровней (рис. 0.3). В зависимости от этого может осуществляться фосфоресцентное излучение двух типов с высокими квантовым выходом: $T_{\pi\pi^*} \rightarrow S_0$ и $T_{\pi\pi^*} \rightarrow S_0$ (Kasha, 1960).

Таким образом, люминесцентные свойства гетероатомных молекул определяются в значительной мере взаимным энергетическим положением нижних $\pi\pi^*$ - и $\pi\pi^*$ -уровней. В свою очередь энергия $\pi\pi^*$ - и $\pi\pi^*$ -уровней определяется строением данной молекулы (в частности, присутствием тех или иных заместителей) и существенно зависит от условий среды (см., например, обзоры: Sidman, 1958; Kasha, 1961).

В неполярных растворителях при нейтральных рН нижним возбужденным синглетным уровнем гетероатомных молекул, как правило, является $\pi\pi^*$ -уровень (Kasha, 1961).

Существенное влияние на энергию $\pi\pi^*$ — n -перехода оказывает присоединение к молекуле различных заместителей. При присоединении к молекуле электрон-донорных заместителей, таких как —ОН, —SH, —NH₂ и др., энергия нижнего синглетного $\pi\pi^*$ -уровня возрастает (Kasha, 1961). Это объясняется тем, что электрон-донорные заместители увеличивают плотность электронного облака в системе сопряженных связей (например, в кольце гетероциклической молекулы), что затрудняет переход локализованного у гетероатома n -электрона на π^* -орбиту. Влияние присоединения различных заместителей на взаимное энергетическое положение $\pi\pi^*$ - и $\pi\pi^*$ -уровней и флуоресцентные свойства пуринов и пиримидинов рассмотрено Борезеном (Börresen, 1963).

К уменьшению разности в энергиях $\pi\pi^*$ - и $\pi\pi^*$ -уровней приводит также увеличение полярности среды: $\pi\pi^* \leftarrow n$ -полоса поглощения при увеличении полярности растворителя смещается в коротковолновую сторону (синее смещение), в то время как $\pi\pi^* \leftarrow \pi$ -полоса обычно при этом смещается в длинноволновую сторону (красное смещение).

Сложное влияние на относительное энергетическое положение $\pi\pi^*$ - и $\pi\pi^*$ -уровней оказывает изменение рН среды. В том случае, если молекула имеет один гетероатом, ответственный за $\pi\pi^* \leftarrow n$ -

¹ Возможно, это правило не является абсолютным. Так, например, Борезен (Börresen, 1963) обнаружил флуоресценцию пиримидина (см. также раздел 2.1) в условиях, когда нижнее возбужденное синглетное состояние является состоянием $\pi\pi^*$ -типа.

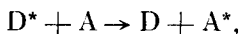
поглощение, протонизация этого атома в кислой среде приводит к исчезновению $\pi^* \leftarrow n$ -полосы поглощения (Kasha, 1961). Это объясняется электростатическим взаимодействием n -электронов, локализованных у гетероатома, с протоном, что затрудняет переход n -электрона на делокализованную π^* -орбиту. При наличии нескольких гетероатомов молекула может иметь соответственно несколько $n\pi^*$ -уровней. Протонизация одного из гетероатомов может облегчить $\pi^* \leftarrow n$ -переходы (уменьшить энергии $n\pi^*$ -уровней), обусловленные другими гетероатомами, так как присоединение протона уменьшает плотность электронного облака в системе сопряженных связей и тем самым облегчает переход n -электрона на делокализованную π^* -орбиту.

Механизм влияния pH, рассмотренный выше, был предложен Борезеном (Börjesen, 1963) для объяснения влияния pH на флуоресцентные свойства пуринов и пиримидинов (см. раздел 2.1).

Таким образом, относительное энергетическое положение $n\pi^*$ - и $\pi\pi^*$ -уровней, а следовательно, и люминесцентные свойства гетероатомных молекул исключительно чувствительны к изменениям условий внешней среды.

0.4. ПЕРЕНОС ЭЛЕКТРОННОЙ ЭНЕРГИИ ВОЗБУЖДЕНИЯ. СЕНСИБИЛИЗИРОВАННАЯ ЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ

Возбуждение молекулы может осуществляться как при непосредственном поглощении кванта энергии, так и в результате безызлучательного переноса электронного возбуждения от другой, предварительно возбужденной молекулы:



где D и A — молекулы донор и акцептор энергии.¹

Излучение молекулы акцептора, возбуждение которой вызвано безызлучательным переносом энергии от другой молекулы — донора энергии, называют сенсibilизированной люминесценцией.

В зависимости от типа взаимодействия между молекулами различают три вида безызлучательного переноса: индуктивно-резонансный, обменно-резонансный и экситонный. Обсуждение роли этих механизмов в переносе электронной энергии возбуждения между молекулами в растворе содержится, например, в обзоре Вилкинсона (Wilkinson, 1964).

Механизм индуктивно-резонансного переноса энергии состоит в том, что электромагнитное поле электронного осциллятора возбужденной молекулы (донора) в результате резонансного взаимо-

¹ Возможен также внутримолекулярный перенос энергии, когда энергия поглощенная одной хромофорной группой молекулы, высвечивается другой группой той же молекулы (см., например: Ермолаев и Теренин, 1960; Lamola et al., 1965).

действия с невозбужденным осциллятором молекулы акцептора индуцирует в нем вынужденные колебания. Это явление можно сравнить с резонансом камертонов с той существенной разницей, что энергия при индуктивно-резонансном взаимодействии молекул передается целиком: в данный момент возбужден либо донор, либо акцептор.

Существенно, что индуктивно-резонансный перенос может происходить на расстояниях, значительно превышающих размеры молекул, т. е. не требует перекрывания электронных оболочек донора и акцептора.

Теория индуктивно-резонансного переноса энергии разработана Ферстером (Förster, 1948, 1959), Галаниным и Франком (1951), Декстером (Dexter, 1953), Галаниным (1960). Вероятность переноса по индуктивно-резонансному механизму прямо пропорциональна величине перекрывания спектров излучения донора и поглощения акцептора и уменьшается пропорционально шестой степени расстояния между донором и акцептором. Характеристикой эффективности переноса по индуктивно-резонансному механизму служит расстояние R_0 между донором и акцептором, при котором излучательная дезактивация донора и перенос энергии на акцептор равновероятны.

При индуктивно-резонансном взаимодействии разрешены лишь те процессы переноса энергии, которые не сопровождаются изменением спинового момента молекул донора и акцептора (Wilkinson, 1964). Этому условию отвечает, например, хорошо изученный синглет-синглетный перенос $D^*(S) + A(S) \rightarrow D(S) + A^*(S)$, приводящий к концентрационному тушению флуоресценции, концентрационной деполяризации флуоресценции, возникновению сенсibilизированной флуоресценции, резонансному тушению флуоресценции посторонними веществами (Вавилов, 1950).

Перенос по индуктивно-резонансному механизму может быть, однако, эффективным также и при наличии спинового запрета в том случае, если процессы дезактивации возбужденного состояния донора также запрещены. Так, безызлучательный триплет-синглетный перенос $D^*(T) + A(S) \rightarrow D(S) + A^*(S)$, существование которого было предсказано Ферстером (Förster, 1959), экспериментально обнаружен Ермолаевым и Свешниковой (1962, 1963).

Значения R_0 для триплет-синглетного переноса близки соответствующим значениям для синглет-синглетного переноса. Это объясняется тем, что наряду с малой вероятностью триплет-синглетного переноса мала также вероятность дезактивации триплетной молекулы донора за счет излучения фосфоресценции: оба процесса интеркомбинационно запрещены и поэтому успешно конкурируют друг с другом (Ермолаев и Свешникова, 1963).

Кроме индуктивно-резонансного взаимодействия, к безызлучательному переносу энергии может приводить обменно-резонансное взаимодействие, возникающее при перекрывании электронных

орбит молекул донора и акцептора (Dexter, 1953). При обменно-резонансном взаимодействии вероятность переноса убывает с расстоянием по экспоненциальному закону, т. е. значительно быстрее, чем в случае индуктивно-резонансного переноса.

Процессы переноса энергии при обменно-резонансном взаимодействии разрешены в том случае, если они отвечают правилу Вигнера, т. е. при сохранении суммарного спинового момента донора и акцептора. Так, процесс безызлучательного переноса энергии электронного возбуждения от триплетной молекулы донора к невозбужденной молекуле акцептора с переносом ее непосредственно на триплетный уровень ($\text{Теренин и Ермолаев, 1952; Ермолаев, 1963}$) $D^*(T) + A(S) \rightarrow D(S) + A^*(T)$ является дважды запрещенным при индуктивно-резонансном механизме взаимодействия, но полностью разрешен при обменно-резонансном взаимодействии. Вопросу триплет-триплетного переноса посвящен ряд обзоров (Ермолаев и Теренин, 1960; Ермолаев, 1963).

0.5. ТУШЕНИЕ ЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ

Уменьшение квантового выхода люминесценции (тушение) может быть обусловлено как внутримолекулярными процессами, так и межмолекулярным взаимодействием люминесцирующей молекулы с молекулами среды. Рассмотрим возможные процессы дезактивации, используя схему энергетических уровней (рис. 0.1). Наряду с излучательными переходами молекула может растратить часть электронной энергии возбуждения на быстрые безызлучательные переходы между колебательными подуровнями (колебательная дезактивация) или перейти из одного возбужденного состояния в другое, той же мультиметности (внутренняя конверсия $S_1 \rightarrow S_0$ или $T_1 \rightarrow T_0$), растратив электронную энергию в колебательную. Наконец, молекула может претерпеть интеркомбинационную конверсию, перейдя при этом в электронное состояние иной кратности с меньшим значением энергии (рис. 0.1). Внутреннюю и интеркомбинационную конверсии можно трактовать как внутримолекулярный перенос энергии (Franck a. Sponger, 1956).

Деградация возбужденного состояния может быть обусловлена также растратой энергии на фотохимическую реакцию: молекула разрушается, затратив энергию возбуждения на разрыв своих собственных химических связей.

В настоящее время нельзя считать решенным вопрос о том, возможна ли непосредственная безызлучательная дезактивация с нижнего возбужденного синглетного уровня. Робинсон и Фрош (Robinson a. Frosch, 1962, 1963) в результате теоретического рассмотрения вопроса о путях деградации энергии электронного возбуждения пришли к выводу, что деградация в основное со-

стояние возможна как с триплетного, так и с синглетного уровней. Ермолаев и Свешникова (1964) экспериментально показали, что для большого числа сложных ароматических молекул при низких температурах деградация энергии в основном осуществляется через триплетный уровень.

Безызлучательной деградацией энергии при интеркомбинационной конверсии с возбужденного синглетного на триплетный уровень ($S_1 \rightarrow T_1$) объясняется эффект температурного тушения флуоресценции. Повышение температуры раствора может привести к уменьшению квантового выхода двумя путями: косвенно, изменяя вязкость растворителя, и непосредственно, вызывая чисто температурный эффект тушения (Левшин, 1951). Во втором случае предполагается, что повышение температуры увеличивает вероятность интеркомбинационной конверсии $S_1 \rightarrow T_1$. Этот процесс имеет энергию активации ΔE , равную разности энергий между нижним уровнем первого синглетного возбужденного состояния и точкой пересечения кривых потенциальной энергии синглетного состояния S_1 и триплетного состояния T_1 (рис. 0.4). Тогда квантовый выход флуоресценции q при наличии температурного тушения будет определяться выражением

$$q = \frac{k_1}{k_1 + k_2 + k_3 e^{-\frac{\Delta E}{kT}}},$$

где k_1 — вероятность излучения флуоресценции, k_2 — вероятность всех безызлучательных процессов в отсутствие температурного тушения, $k_3 e^{-\frac{\Delta E}{kT}}$ — вероятность температурного тушения, k — постоянная Больцмана, T — абсолютная температура.

Различные вещества могут вызывать тушение, либо влияя на константу скорости внутримолекулярной конверсии, либо выступая в качестве акцепторов энергии при межмолекулярном переносе энергии. Тушители первого типа называются нерезонансными, а второго — резонансными.

Механизмы влияния нерезонансного тушителя на скорость внутримолекулярной конверсии различны, но во всех случаях необходимым условием является соударение возбужденных молекул флуоресцирующего вещества с молекулами тушителя (Вави-

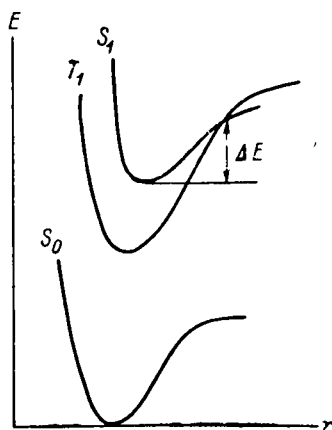


Рис. 0.4. Схема, иллюстрирующая механизм температурного тушения флуоресценции.

S_0 , S_1 , T_1 — потенциальные кривые синглетных уровней — основного и нижнего возбужденного и нижнего триплетного соответственно. ΔE — энергия активации $S_1 \rightarrow T_1$ перехода.

лов, 1936, 1950; Свешников, 1952). Поэтому для этого вида тушения важнейшее значение имеет диффузия молекул, происходящая за время жизни возбужденного состояния.

Согласно представлениям Вавилова и Свешникова, тушение этого вида описывается уравнением

$$\frac{q_0}{q} = (1 + 4\pi\rho DR\tau_0 C)\delta, \quad (0.8)$$

где q_0 и q — квантовые выходы в отсутствии и в присутствии тушителя соответственно, τ_0 — среднее время жизни возбужденного состояния флуоресцирующих молекул в отсутствие тушения, R — сумма радиусов флуоресцирующей молекулы и молекулы тушителя, D — коэффициент диффузии, ρ — коэффициент, учитывающий вероятность тушения при соударении, δ — множитель, несколько больший единицы и слабо зависящий от концентрации тушителя.

У резонансного тушителя спектр поглощения перекрывается со спектром излучения молекулы люминесцирующего вещества. Тушащее действие таких веществ обусловлено безызлучательной миграцией энергии от люминесцирующей молекулы (донора) к молекуле тушителя (акцептору) по индуктивно-резонансному механизму (см. раздел 0.4). При этом возможно возникновение сенсibilизированной люминесценции молекул тушителя. Теория резонансного тушения посторонними веществами развита в работах Ферстера, Вавилова и Галанина (Förster, 1948; Вавилов, 1950; Галанин, 1955). Резонансное тушение не требует соударения люминесцирующих молекул и молекул тушителя, и поэтому не зависит от вязкости раствора.

Частным случаем резонансного тушения является концентрационное тушение (Вавилов, 1950): квантовый выход люминесценции уменьшается для данного вещества с некоторого значения концентрации. Концентрационное тушение может быть обусловлено также образованием ассоциатов, например, димеров или эксимеров, т. е. комплексов возбужденной молекулы с невозбужденной.

Тушение, обусловленное переносом, может происходить и по другим, названным выше механизмам: экситонному или обменно-резонансному.

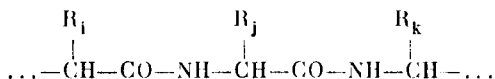
ФОТОЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ АРОМАТИЧЕСКИХ АМИНОКИСЛОТ, СИНТЕТИЧЕСКИХ ПОЛИПЕПТИДОВ, БЕЛКОВ И КЛЕТОК

Фотолюминесценция белков может быть обусловлена входящими в их состав аминокислотами (так называемая собственная люминесценция) или различными простетическими группами, если такие группы присутствуют в молекуле белка. Для исследования структуры белков, кроме того, используется люминесценция белков с искусственно присоединенными группами (красителями), в которых люминесцирует краситель (вторичная люминесценция).

В этой главе рассматривается лишь собственная люминесценция белков и обуславливающая ее люминесценция ароматических аминокислот. При этом основное внимание уделяется факторам, определяющим люминесцентные свойства этих объектов, и связи между структурой белка и его люминесценцией. В то же время широко используемое на практике и ставшее классическим применение люминесценции для аналитических целей не рассматривается. Читатель, интересующийся этим вопросом, может обратиться к весьма подробной, но уже несколько устаревшей монографии Юденфренда (Udenfriend, 1962).

Белки — это линейные сополимеры аминокислот

$$(H_2N-\overset{\overset{R}{|}}{CH}-COOH), \text{ соединенных пептидными связями } (-CO-NH-):$$

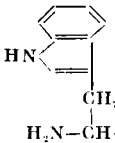
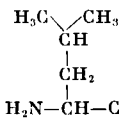
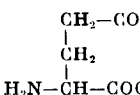


Наиболее часто в составе белков обнаруживаются 20 различных аминокислот, отличающихся друг от друга радикалом R. В табл. 1.1 приведены структурные формулы и указаны значения pK для тех аминокислот, которые будут встречаться в ходе дальнейшего изложения.

В отличие от обычных сополимеров небиологического проис-

Таблица 1.1

ХИМИЧЕСКОЕ СТРОЕНИЕ И ЗНАЧЕНИЯ pK НЕКОТОРЫХ АМИНОКИСЛОТ

Аминокислоты	Сокращенное обозначение	Химическая формула	pK_1	pK_2	pK_3
Триптофан	Три	 $\begin{array}{c} \text{HN} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{C}_6\text{H}_4 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{COOH} \end{array}$	2.38	9.39	
Тирозин	Тир	 $\begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{C}_6\text{H}_4 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{COOH} \end{array}$	2.20	9.41	10.07 (ОН)
Фенилаланин	Фен	 $\begin{array}{c} \text{C}_6\text{H}_5 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{COOH} \end{array}$	1.83	9.13	
Глицин	Гли	 $\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{COOH} \end{array}$	2.34	9.60	
Лейцин	Лей	 $\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C} \quad \text{CH}_3 \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{CH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{COOH} \end{array}$	2.36	9.60	
Глутаминовая кислота	Глу	 $\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{COOH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{COOH} \end{array}$	2.10	9.47	4.07 (COOH)
Лизин	Лиз	 $\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{NH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{COOH} \end{array}$	2.18	8.95	10.53 (NH ₂)

Примечание. Значения pK_1 и pK_2 характеризуют диссоциацию COOH - и NH_2 -групп соответственно; значения pK_3 отвечают диссоциации групп, указанных рядом в скобках. Все значения pK даны по Штраубу (Straub, 1961).

хождения белки являются химически индивидуальными веществами с определенной последовательностью и числом составляющих их аминокислотных остатков (первичная структура белка).

Химические связи вдоль полипептидной цепи являются единичными (кроме пептидной, которая частично сопряжена) и допускают возможность свободного вращения вокруг них. Это, однако, не приводит в случае нативного белка к сворачиванию полипептидной цепи в статистический клубок. Образование водородных связей между карбонильными и амидными группами полипептидной цепи стабилизирует относительное расположение ее звеньев и приводит к образованию упорядоченной структуры — вторичной структуры белка.

Возможны различные конформации полипептидной цепи. В первую очередь это α -спираль Полинга—Кори, в которой аминокислотные остатки располагаются в строгом порядке по винтовой линии таким образом, что каждый остаток связан двумя водородными связями со своими соседями, четвертыми по счету вдоль полипептидной цепи. Модель α -спиральной структуры была предложена Полингом и Кори на основании теоретических представлений, а затем существование такой структуры было подтверждено экспериментально при рентгеноструктурном исследовании белков и синтетических полипептидов.

Вторичная структура не обязательно спиральная. Так, у синтетических полипептидов обнаружена так называемая кросс- β -структура, в которой водородные связи соединяют соседние участки зигзагообразно уложенной полипептидной цепи. Во всех рассмотренных выше случаях вторичная структура стабилизирована внутримолекулярными водородными связями и может быть устойчивой в растворе. Примером вторичной структуры, возникающей за счет межмолекулярных связей, является β -структура, в которой зигзагообразно уложенные и параллельные друг другу полипептидные цепи связаны между собой водородными связями. Нужно отметить, что полипептидная цепь никогда не может быть полностью упорядоченной. Вторичная структура полипептидной цепи — это сочетание упорядоченных и неупорядоченных участков.

Кроме первичной и вторичной, макромолекула белка может иметь еще третичную структуру. Под этим термином понимается упаковка спирали или иной формы белковой цепи в глобулу. Стабилизация третичной структуры (глобулы) определяется различными силами. В первую очередь здесь следует назвать дисульфидные связи между остатками цистеина; водородные связи между различными группами боковых цепей; электростатические силы между заряженными боковыми и концевыми группами; ван-дер-ваальсовы силы, обусловленные наличием дипольных моментов или поляризуемостью боковых групп; наконец, гидрофобные силы, связанные с различной «растворимостью» боковых групп полипептидной цепи. Последнее приводит к тому, что полярные группы,

взаимодействуя с водой, оказываются на поверхности макромолекулы, а неполярные углеводородные радикалы стремятся собраться внутри нее.

Агрегация нескольких макромолекул белка в результате взаимодействий различной природы может привести к образованию надмолекулярной четвертичной структуры. Подробные сведения о структуре белков, полезные для анализа последующего материала, можно найти в книгах Бреслера (1963) и Волькенштейна (1965).

1.1. ЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ АМИНОКИСЛОТ

Присутствие остатков ароматических аминокислот, как это будет подробно показано в дальнейшем, определяет люминесцентные свойства белков и синтетических полипептидов.* Ароматические аминокислоты — триптофан,** тирозин и фенилаланин — обладают системой делокализованных π -электронов в ароматических ядрах и поглощают свет в области длин волн 240—300 мкм (рис. 1.1). При возбуждении в этой области спектра они флуоресцируют в растворах (Teale a. Weber, 1957) и в кристаллах (Барский и Брумберг, 1958) при комнатной и низкой температурах (Владимиров и Бурштейн, 1960).

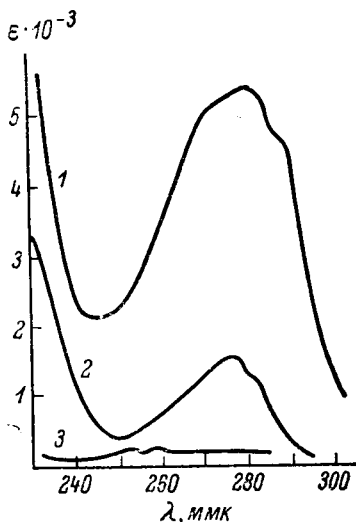


Рис. 1.1. Спектры поглощения нейтральных растворов аминокислот (McLaren a. Shugar, 1964).

1 — триптофан, 2 — тирозин, 3 — фенилаланин. ϵ — молярный коэффициент поглощения.

При температуре жидкого азота можно наблюдать фосфоресценцию этих же аминокислот в замороженных растворах (Debay a. Edwards, 1952) и порошках (Nag-Chaudhuri a. Augenstein, 1964).

При включении аминокислот в состав молекулы белка их α -амино- и карбоксильная группы входят в пептидную связь. Поэтому основное внимание в этом разделе уделено выяснению влияния этих групп на

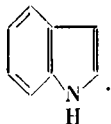
* В этой главе не рассматриваются сами по себе очень интересные, но окончательно не выясненные вопросы о люминесценции алифатических аминокислот (Rybac et al., 1955; Dimartin et al., 1957; Longin, 1959; Douzou a. Francq, 1962) и о люминесценции ароматических аминокислот и белков при возбуждении в областях спектра, где отсутствуют заметные полосы поглощения (Steele a. Szent-Györgyi, 1957, 1958; Isenberg a. Szent-Györgyi, 1958; Fujimori, 1960).

** Триптофан является гетероциклической аминокислотой, но в литературе, посвященной люминесценции аминокислот и белков, принято все

люминесцентные свойства хромофоров ароматических аминокислот. Другие факторы, как внутримолекулярные, так и связанные с внешней средой, которые также влияют на люминесцентные свойства ароматических остатков в сополимере, рассматриваются в разделах, посвященных непосредственно люминесценции белков.

Индол и триптофан

Свечение триптофана определяется индольным кольцом



Индол и триптофан в нейтральном водном растворе при комнатной температуре имеют сходные сплошные спектры флуоресценции с максимумом около 350 мкм. Спектр флуоресценции триптофана показан на рис. 1.2. Спектр фосфоресценции имеет выраженную структуру с максимумами при 405, 430 и 456 мкм. Структура спектра фосфоресценции индола и триптофана лучше всего проявляется в малополярных средах (Freed a. Salmre, 1958). Время затухания фосфоресценции, по данным Дебая и Эдвардса (Debay a. Edwards, 1952), составляет 3 сек., а по данным Лонгворта (Longworth, 1961) — 5.3 сек. Кроме того, одним из авторов этой книги (Баренбойм, 1962) было обнаружено послесвечение замороженных растворов триптофана, спектрально совпадающее с его флуоресценцией и экспоненциально спадающее во времени (α -фосфоресценция).

Квантовый выход флуоресценции триптофана ($q=0.2$) в нейтральном водном растворе в два раза меньше, чем у индола ($q=0.4$). Это различие обусловлено влиянием на флуоресценцию индольного кольца добавочной группы атомов («заместителя»), отличающей триптофан от индола.

Влияние самых различных заместителей на квантовый выход флуоресценции индольного кольца было изучено Уайтом (White,

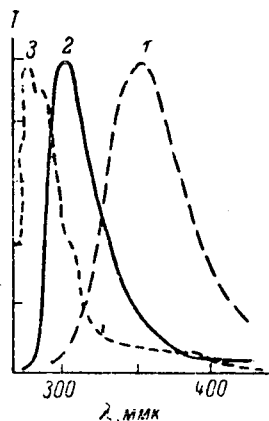


Рис. 1.2. Спектры флуоресценции аминокислот в нейтральном водном растворе при комнатной температуре (Бурштейн, 1961).

1 — триптофан, 2 — тирозин, 3 — фенилаланин. I — интенсивность флуоресценции (отн. ед.).

три аминокислоты — триптофан, тирозин и фенилаланин — называть ароматическими. В дальнейшем изложении мы будем придерживаться этой терминологии.

1959) и более подробно Ковгиллом (Cowgill, 1963a). Последний пришел к заключению, что влияние заместителя на квантовый выход определяется его способностью притягивать к себе электроны (электроотрицательностью): увеличение электроотрицательности заместителя приводит к уменьшению плотности электронного облака в кольце и к падению выхода.

Из этих представлений следует, что влияние группы атомов, определяющих электроотрицательность заместителя на квантовый выход хромофора, должно быстро убывать с увеличением расстояния этой группы от хромофора. В полном соответствии с этим

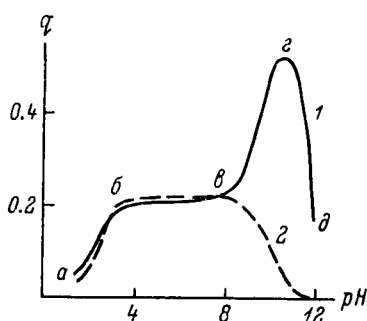


Рис. 1.3. Изменение квантового выхода (q) триптофана (1) и тирозина (2) в зависимости от pH среды (Cowgill, 1963a).

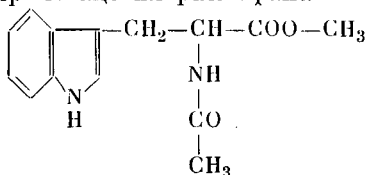
Объяснения в тексте.

величина квантового выхода соединения индол— $\text{CH}_2\text{—COO}^-$ ($q=0.38$) приближается к значению для индола ($q=0.40$), в то время как у соединения индол— COO^- ($q=0.25$) группа COO^- приводит к существенному снижению квантового выхода (Cowgill, 1963a).

Так как электроотрицательность заместителя зависит от состояния ионизации, то из гипотезы Ковгилла также следует, что изменение состояния ионизации NH_2 - и COOH -групп триптофана должно влиять на выход флуоресценции. Действительно, выход флуоресценции триптофана зависит от pH среды (White, 1959;

Владимиров и Ли Чинь-го, 1962; Cowgill, 1963a). На рис. 1.3 видно, что в кислой области (кривая 1, отрезок ab) флуоресценция наполовину потушена при pH 2.4. Это значение pH, соответствующее наполовину потушенному свечению, будем в дальнейшем обозначать $\text{pK}_{\text{фл}}$. В данном случае $\text{pK}_{\text{фл}}$ совпадает с величиной pK карбоксильной группы (напомним, что pK численно равно значению pH, при котором концентрации ионизированных и неионизированных форм молекулы равны). Аналогичное совпадение наблюдается для pK ионизации аминогруппы и $\text{pK}_{\text{фл}}$ триптофана в щелочной области (pH 9.4; рис. 1.3, кривая 1, отрезок bc).

Метилловый эфир *N*-ацетилтриптофана



у которого amino- и карбоксильная группы блокированы и не способны к кислотно-основной диссоциации, сохраняет постоянное значение выхода при pH от 2 до 11 (Cowgill, 1963a).

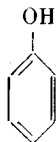
Изменение состояния ионизации amino- и карбоксильной групп триптофана приводит к небольшим сдвигам максимума спектра флуоресценции (Владимиров и Ли Чинь-го, 1962).

Тушение флуоресценции триптофана в области рН, соответствующей отрезку *gd* кривой *I* на рис. 1.3, связывают с ионизацией иминогруппы индольного кольца. Влияние NH-группы на флуоресценцию индола подтверждается тем, что блокирование этой группы путем ее метилирования (Weber, 1961a) или при взаимодействии с формальдегидом (Конев и Черницкий, 1964) приводит к независимости квантового выхода от изменения рН в щелочной среде.

Так как обычные методы титрования не обнаружили ионизации NH-группы индола в щелочной среде, Уайт (White, 1959) предположил, что ионизированная форма образуется только в возбужденном состоянии: $R-NH \xrightarrow{h\nu} R^*-NH \xrightarrow{OH^-} R^*-N^- + H^+$, и что она не способна к флуоресценции. Однако совсем недавно Конев и Черницкий (1965) обнаружили слабую флуоресценцию индола ($\lambda_{max}=405$ мкм) и триптофана ($\lambda_{max}=420$ мкм) в сильно щелочной среде и приписали это свечение той же ионной форме: $R^*-N^- \rightarrow R-N^- + h\nu$. Таким образом, можно считать, что ионизация иминогруппы влияет на люминесценцию индола и триптофана, кислотно-основные свойства которых различаются в основном и возбужденном состояниях.¹

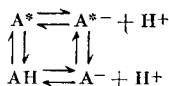
Фенол и тирозин

Свечение тирозина определяется фенольным кольцом:



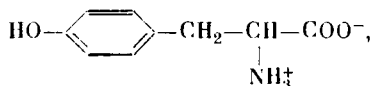
Флуоресценция фенола, тирозина и других производных фенола в нейтральном водном растворе при комнатной температуре характеризуется сходными сплошными спектрами с максимумами

¹ В литературе (см., например, Владимирова и Ли Чинь-го, 1962) встречается представление о том, что pK_{fl} совпадает с pK молекул в возбужденном состоянии (pK^*). Однако это справедливо далеко не всегда, что можно проиллюстрировать следующей схемой:



Очевидно, что pK_{fl} зависит от соотношения скоростей всех процессов, обозначенных стрелками. В случае, когда скорость дезактивации возбужденного состояния много больше скорости ионизации в возбужденном состоянии,

около 303 мкм. Спектр флуоресценции тирозина представлен на рис. 1.2. Максимум спектра фосфоресценции тирозина наблюдается при 387 мкм. Время затухания фосфоресценции сильно зависит от условий среды (Nag-Chaudhuri a. Augenstein, 1964). По данным Дебая и Эдвардса (Debay a. Edwards, 1952), оно составляет 3 сек. в нейтральной среде и 0.9 сек. в щелочной, а по данным Лонгворха (Longworth, 1961) — 2.1 сек. Хотя квантовые выходы фенола ($q=0.20$) и тирозина ($q=0.21$) близки, другие примеры показывают, что присоединение различных групп (заместителей) к фенольному кольцу определяет в значительной мере квантовый выход соединения; например, фенол— CH_3 имеет квантовый выход 0.25, а фенол— COOH — 0.01 (Cowgill, 1963a). Измерив квантовые выходы большого числа производных фенола, Ковгилл пришел к выводу, что влияние заместителей, так же как и для индола, объясняется их различной способностью оттягивать электроны из ароматического кольца, т. е. их электроотрицательностью. При этом квантовый выход флуоресценции, определяемой фенольным кольцом, уменьшается с ростом электроотрицательности заместителя. Электроотрицательность заместителя зависит от состояния ионизации. Поэтому ионизация COOH - и NH_2 -группы тирозина должна влиять на выход флуоресценции. Квантовый выход тирозина в области рН от 4 до 8, где тирозин является биполярным ионом



равен 0.21. В кислой среде выход уменьшается и при рН 2.5 становится вдвое меньше (рис. 1.3), что хорошо соответствует рК диссоциации карбоксильной группы.

В щелочной среде на квантовый выход флуоресценции фенола, его производных и, в частности, тирозина основное влияние оказывает ионизация OH -группы, приводящая к тушению флуоресценции. Доказательством этого может служить хорошее совпадение рК ионизации гидроксильной группы фенола и значения рН, соответствующего половинному тушению флуоресценции ($\text{pK}_{\text{ф.л}}$) тирозина и фенола в щелочной среде. В той же области рН флуоресценция анизола ($\text{C}_6\text{H}_5\text{OCH}_3$) не претерпевает изменений (White, 1959). Ионизация OH -группы тирозина приводит также к спектральным сдвигам. В работе Корнога и Адамса (Cornog a. Adams, 1963) обнаружена очень слабая флуоресценция тирозина с ионизированной OH -группой. Максимум спектра флуоресценции при этом значительно (на 30 мкм) сдвинут в длинноволновую сторону по сравнению с максимумом спектра неионизированной формы.

$\text{pK}_{\text{ф.л}}$ должно совпадать с рК соответствующих групп молекулы в основном состоянии. В общем случае $\text{pK}_{\text{ф.л}}$ может принимать любые значения между рК и pK^* .

Исходя из представлений Ковгилла, следовало бы ожидать некоторого увеличения квантового выхода флуоресценции тирозина при диссоциации его NH_3^+ -группы, как это наблюдается для триптофана. Однако диссоциация NH_3^+ -групп не отражается на зависимости квантового выхода тирозина от pH (White, 1959; Владимиров и Ли Чинь-го, 1962). Можно допустить, что возрастание квантового выхода флуоресценции тирозина, связанное с диссоциацией NH_3^+ -группы, маскируется резким уменьшением выхода из-за ионизации ОН-группы.*

В одной из последних работ Ковгилла (Cowgill, 1965b), показал, что диссоциация NH_3^+ -групп оказывает влияние на ход зависимости квантового выхода от pH для дипептидов Гли—Тир и Тир—Гли. Зависимость интенсивности флуоресценции от pH для этих двух дипептидов оказалась несколько различной, что может быть связано как с различиями в значениях pK, так и с различной удаленностью аминогрупп в этих соединениях от ароматического кольца.

Фенилаланин

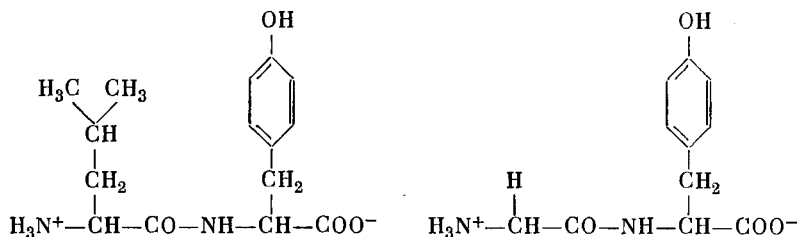
Свечение фенилаланина определяется бензольным кольцом. Фенилаланин в отличие от других ароматических аминокислот имеет структурированный спектр (максимумы при 282 и 289 мкм и «плечи» при 298 и 305 мкм), который близок к зеркальному отражению спектра поглощения. Квантовый выход фенилаланина, который в нейтральном водном растворе составляет всего 0.04, меняется от степени ионизации amino- и карбоксильной групп (Владимиров и Ли Чинь-го, 1962; Feitelson, 1964). Флуоресценция фенилаланинового остатка практически не проявляется в белках (см. раздел 1.2). В связи с этим мы не будем рассматривать люминесцентные свойства фенилаланина, как не представляющие интерес для последующего изложения, посвященного в основном биополимерам. Данные о люминесценции фенилаланина можно найти в ряде работ (Бурштейн, 1961; Udenfriend, 1962; Feitelson, 1964; Nag-Chaudhuri a. Augenstein, 1964; Yeagers a. Augenstein, 1965).

* * *

Флуоресценция ароматических аминокислот — триптофана, тирозина и фенилаланина — определяется индольным, фенольным и бензольным кольцами соответственно. Квантовый выход зависит от состояния ионизации ОН-группы тирозина, NH-группы триптофана, COOH- и NH_2 -групп этих аминокислот.

* Истинный ход кривой тушения должен определяться относительной концентрацией четырех форм тирозина, отличающихся различными комбинациями групп ОН, O^- , NH_3^+ и NH_2 , в зависимости от соотношения pH среды и pK этих форм, измеренных, в частности, в работе Ямазаки и др. (Yamazaki et al., 1965).

Предполагается, что механизм влияния amino- и карбоксильной групп на флуоресценцию аминокислот определяется их электроотрицательностью. Несмотря на то что это представление, развиваемое Ковгиллом, находит ряд экспериментальных подтверждений, тем не менее оно принимается не всегда и не всеми. Так, Фейтельсон (Feitelson, 1964) считает, что группы, отделенные от хромофора несколькими одиночными связями, не могут оказывать сколько-нибудь значительного индуктивного влияния на флуоресцентные свойства хромофоров. По мнению Вебера и Фейтельсона, уменьшение квантового выхода флуоресценции триптофана (Weber, 1961a), тирозина и фенилаланина (Feitelson, 1964) в кислой среде объясняется не индуктивным влиянием COOH -группы, а непосредственным взаимодействием этой группы с ароматическим кольцом, приводящим к тушению (см. стр. 40). Кроме того, сам Ковгилл (Cowgill, 1963a) указывает, что, учитывая лишь электроотрицательность заместителей, нельзя понять, почему такие соединения как Лей—Тир и Гли—Тир



имеют различные квантовые выходы, первый — 0.103 и второй — 0.070.

Каковы бы ни были причины влияния COOH - и NH_2 -групп на флуоресценцию ароматических аминокислот, ясно, что флуоресцентные свойства свободных аминокислот в растворе не могут служить эталоном при рассмотрении флуоресценции белков; ароматические аминокислоты в белке включены в полипептидную цепь и не имеют свободных amino- и карбоксильных групп, состояние диссоциации которых определяет квантовый выход этих аминокислот в растворе.

С другой стороны, факторы, влияющие на NH -группу триптофана, OH -группу тирозина или прямо на хромофорное кольцо, могут оказывать сходное воздействие на флуоресценцию аминокислот в растворе и в составе полипептидной цепи.

1.2. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ БЕЛКОВ

Более ста лет тому назад Сеченов, Стокс и Реньо впервые наблюдали флуоресценцию тканей и органов, богатых белками, а в 1883 г. Соре качественно изучал люминесценцию миозина

(цит. по: Бурштейн, 1964). Несмотря на такую почти вековую историю изучения люминесценции белков, количественное исследование ее началось сравнительно недавно, после появления в пятидесятых годах текущего столетия высокочувствительных приемников света — фотоэлектронных умножителей.

Многочисленные исследования показали, что почти все исследованные белки люминесцируют при комнатной и низкой температурах при возбуждении в ультрафиолетовой области (см. обзоры: Бурштейн, 1961, 1964; Weber, 1961a; Udenfriend, 1962). Люминесценция не обнаружена лишь у протаминов (клубенин и стурнин), в молекулы которых не входят ароматические аминокислоты. Эти и другие наблюдения привели к выводу, что ультрафиолетовая люминесценция белков обусловлена ароматическими аминокислотами: триптофаном, тирозином и фенилаланином. Эти же аминокислоты определяют спектры поглощения белков в области длин волн 240—300 мкм. Подробные сведения о спектрах поглощения белков можно найти в ряде обзоров (Beaven, 1961; Wetlaufer, 1962; McLaren a. Shugar, 1964).

Флуоресценция

Вклад ароматических аминокислот во флуоресценцию белка различен. Поэтому в литературе обычно принято подразделять белки по их люминесцентным свойствам на два класса: а) содержащие триптофан, б) содержащие из ароматических аминокислот только тирозин и фенилаланин.

Т р и п т о ф а н с о д е р ж а щ и е б е л к и. Флуоресценция триптофансодержащих белков, несмотря на наличие других ароматических аминокислот в белке, определяется в основном триптофановыми остатками. Это справедливо даже для такого белка, как сывороточный альбумин человека, в котором на единственный остаток триптофана приходится 17—18 остатков тирозина и 33 остатка фенилаланина. Спектры флуоресценции нативных триптофансодержащих белков сдвинуты по сравнению со спектром свободного триптофана в растворе в коротковолновую область, и их положение различно для разных белков. Так, например, в водном растворе при комнатной температуре максимум спектра флуоресценции трипсина наблюдается при 332 мкм, химотрипсина — при 334 мкм, сывороточного альбумина свиньи — при 342 мкм.

Сильно различаются и квантовые выходы белков этого класса: при $\lambda_{\text{возб}}=280$ мкм квантовый выход гамма-глобулина свиньи равен 0.152, сывороточного альбумина свиньи — 0.038 (Teale, 1960). Квантовый выход триптофансодержащих белков существенно повышается при изменении длины волны возбуждающего света от 280 до 300 мкм, по мере того как доля света, поглощаемого тирозиновыми остатками, уменьшается до нуля (Teale a. Weber, 1959; Teale, 1960). Этот факт наряду со сходством спектров воз-

буждения и формы спектров флуоресценции белков и триптофана в растворе является убедительным доказательством определяющей роли триптофановых остатков во флуоресценции триптофансодержащих белков. Однако в незначительной степени тирозин все же вносит вклад во флуоресценцию триптофансодержащих белков. Вебер (Weber, 1961c), применяя специально разработанную им методику анализа флуорометрических данных (Weber, 1961b), обнаружил два компонента в спектрах флуоресценции сывороточных альбуминов человека и свиньи и овальбумина. Первый и основной компонент — триптофановый, а второй — тирозиновый с максимумом флуоресценции при 305 ± 3 мкм и квантовым выходом 0.018—0.022. Наличие тирозиновой составляющей в спектрах флуоресценции триптофансодержащих белков подтверждено также Бобровичем и Коневым (1965).

Белки, не содержащие триптофана. Флуоресценция этих белков определяется тирозиновыми остатками, что следует из сходства спектров флуоресценции и возбуждения флуоресценции белков и свободного тирозина в растворе. Такие белки имеют низкий квантовый выход. Так, для двух ингибиторов трипсина белковой природы, исследованных Тилом и Вебером (Teale a. Weber, 1959; Weber, 1961a), квантовый выход оказался меньше 0.01. Наибольший выход флуоресценции для нативных белков этого класса в водном растворе обнаружен у инсулина — 0.037 (Teale, 1960). Значение квантового выхода белка определяется квантовыми выходами всех тирозиновых остатков: если белок содержит несколько тирозиновых остатков, то их квантовые выходы могут значительно отличаться друг от друга. Так, по-видимому, в рибонуклеазе три тирозиновых остатка имеют квантовый выход 0.055, в то время как остальные три — значительно более низкий квантовый выход, менее 0.002 (Cowgill, 1965b). Величина 0.055 является максимальной из обнаруженных величин квантового выхода тирозинового остатка в белке при нейтральных значениях pH. Именно такое значение выхода обнаружено для низкомолекулярного полипептида окситоцина и денатурированной путем обработки мочевиной и меркаптоэтанолом рибонуклеазы (Cowgill, 1964a).

Таким образом, квантовый выход флуоресценции тирозинового остатка в белках, как содержащих, так и не содержащих триптофан, одинаково низок.

Фенилаланиновый компонент в спектрах флуоресценции белков ни в одном случае не был обнаружен; это, возможно, связано с относительно низким коэффициентом поглощения фенилаланина и с его малым квантовым выходом.

Фосфоресценция

В замороженных до температуры жидкого азота растворах белков наряду с флуоресценцией наблюдается фосфоресценция, ко-

торая, так же как и флуоресценция, определяется входящими в состав белков остатками ароматических аминокислот (см. обзор: Бурштейн, 1961).

Работы, посвященные изучению фосфоресценции белков, в значительной мере стимулировались развитыми Сент-Дьердьи (Szent-Györgyi, 1957) представлениями о важной роли электронных возбужденных состояний (особенно триплетных) в различных процессах жизнедеятельности. Интерес биологов к этим исследованиям в значительной мере ослаб после того, как выяснилось, что возбужденные электронные состояния вряд ли играют существенную роль в «темновых» процессах. Утрата интереса к фосфоресценции привела к тому, что в то время как число работ по флуоресценции белков за последние два-три года резко возросло, нам известно всего лишь несколько работ, посвященных фосфоресценции белков (Longworth, 1961; Augenstein a. Nag-Chaudhuri, 1964; Nag-Chaudhuri a. Augenstein, 1964,) опубликованных после 1960 г. и не отраженных в обзоре Бурштейна. Эти работы не дают пока возможности оценить значение исследований фосфоресценции белков для понимания их структуры и функции.

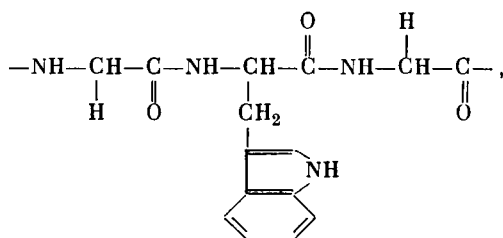
1.3. ФЛУОРЕСЦЕНЦИЯ И СТРУКТУРА БЕЛКОВ

Даже беглый обзор люминесцентных свойств белков, приведенный выше, показывает, что спектры флуоресценции, а главное квантовые выходы ароматических аминокислот при включении их в белковую молекулу резко изменяются. Так, например, квантовый выход триптофансодержащих белков — гамма-глобулина и сывороточного альбумина быка — составляет 0.038 и 0.152 соответственно, в то время как для триптофана он равен 0.20. Еще сильнее заметна разница, если сравнить квантовые выходы тирозина (0.21) и рибонуклеазы (0.017), свечение которой определяется тирозиновыми остатками. В этом параграфе будут рассмотрены факторы, определяющие эти различия и связанные со структурой макромолекулы белка.

Включение ароматических аминокислот в полипептидную цепь

При рассмотрении влияния включения ароматических аминокислот в полипептидную цепь белка на люминесцентные свойства индольного, фенольного и бензольного колец мы остановимся только на тех воздействиях на хромофоры, которые осуществляются через посредство химических связей между соседними аминокислотными остатками. Тем самым мы рассмотрим идеализированную полипептидную цепочку, вытянутую вдоль пептидных связей.

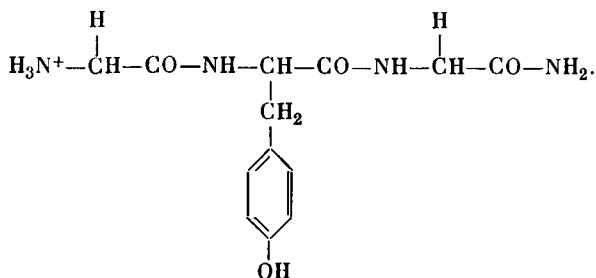
Представим себе, например, образованный из триптофана и наиболее простой по строению аминокислоты — глицина отрезок полипептидной цепи



в котором α-амино- и карбоксильная группы, состояние ионизации которых определяет квантовый выход триптофана в растворе, вошли в пептидную связь. Это должно привести к тому, что флуоресцентные свойства ароматических аминокислот в растворе и в составе полипептидной цепи белка будут сильно различаться. Поэтому использование при люминесцентном анализе белков тех данных, которые получены путем изучения флуоресценции смеси ароматических аминокислот в концентрациях, эквивалентных их содержанию в конкретном белке, представляется нам неоправданным, хотя такой прием используется в работах Владимирова и Бурштейна (1960), Бурштейна (1964) и др.

На первый взгляд может показаться, что флуоресцентные свойства остатков ароматических аминокислот в полипептидной цепи должны приближаться к свойствам их хромофоров (индола, фенола и бензола) в растворе. Однако это не так. Ковгилл (Cowgill, 1963a, 1963b) считает, что в белках на флуоресценцию хромофоров влияет электроотрицательность пептидной связи, что во многих случаях может объяснить низкий квантовый выход флуоресценции некоторых белков. Доказательством этому служит значительно более низкий квантовый выход различных ди- и трипептидов по сравнению со свободными аминокислотами (табл. 1.2).

Для анализа влияния пептидной связи на флуоресценцию остатков ароматических аминокислот представляет интерес рассмотреть люминесцентные свойства глицилтирозилглицинамида:



Электроотрицательные группы, способные влиять на квантовый выход тирозинового остатка, за исключением групп, входящих в пептидные связи, значительно удалены от кольца. Поэтому глицилтирозилглицинамид может служить своеобразным эталоном флуоресценции тирозина, включенного в полипептидную цепь. Его квантовый выход составляет 0.035 (Cowgill, 1963a), что по порядку величины совпадает с квантовым выходом тирозинового остатка в белках.

Таблица 1.2

КВАНТОВЫЙ ВЫХОД ФЛУОРЕС-
ЦЕНЦИИ НЕКОТОРЫХ ПЕПТИДОВ
(Cowgill, 1963a)

Вещество	Число пептидных связей	Квантовый выход
Тирозин . . .	0	0.21
Гли—Тир . .	1	0.07
Тир—Гли . .	1	0.07
Гли—Тир— глицинамид	3	0.035
Триптофан . .	0	0.20
Гли—Три . .	1	0.05

Однако, на наш взгляд, такая модель имеет существенный недостаток: в растворе молекула глицилтирозилглицинамида будет иметь определенную конфигурацию и, возможно, в принципе сближение хромофора с другой частью молекулы, в частности, хромофор может оказаться сближенным с тушащей NH_2 -группой (см. следующий раздел).

Таким образом, флуоресцентные свойства остатков ароматических аминокислот в составе молекулы белка и свободных аминокислот в растворе резко различаются. Наиболее сильное действие на хромофоры, приводящие к уменьшению их квантового выхода, оказывает пептидная связь. Поэтому влияние первичной структуры на флуоресценцию хромофоров должно быть в основном идентичным для разных белков. Уже само включение ароматических аминокислот в полипептидную цепь может объяснить низкий квантовый выход некоторых белков.

Влияние тушащих групп

Боковые цепи ряда аминокислот имеют в своем составе группы, способные при сближении с остатками ароматических аминокислот приводить к тушению флуоресценции последних. В первую очередь к таким тушителям флуоресценции в белке можно отнести карбоксильные группы остатков аспарагиновой и глутаминовой кислот, аминогруппы остатков лизина и аргинина. Этот вывод следует из экспериментов по тушению флуоресценции ароматических аминокислот в растворе веществами, содержащими амино- или карбоксильные группы (Teale, 1960; Weber, 1961a; Weber a. Wold, 1963; Feitelson, 1964; Weber a. Rosenheck, 1964). Эффективность и механизм тушащего действия этих групп зависит от состояния их ионизации.

Тушащее влияние COO^- - и NH_2 -групп. Вещества, содержащие COO^- - или NH_2 -группы, вызывают значительное снижение квантового выхода флуоресценции тирозина и родственных ему соединений, несущих OH -группу (Feitelson, 1964; Weber a. Rosenheck, 1964). В то же время эти вещества не влияют на флуоресценцию фенилаланина и анизол (О-метилированный фенол). Эти данные позволяют заключить, что действие рассматриваемых тушителей связано с присутствием OH -группы. Фейтельсон (Feitelson, 1964) предполагает, что присутствие групп COO^- или NH_2 увеличивает скорость диссоциации OH -группы в возбужденном состоянии, либо непосредственно реагируя с протоном OH -группы тирозина, либо влияя на ее диссоциацию каталитически.

Тушащее влияние COOH - и NH_3^+ -групп. Тушащее влияние уксусной кислоты и гидроксилamina, содержащих эти группы, на флуоресценцию индола и его производных отмечено Вебером (Weber, 1961a). При этом гидроксилamin тушит флуоресценцию индола и его производных значительно эффективнее, чем флуоресценцию производных фенола.

Тушение флуоресценции производных фенола карбоксильными кислотами (т. е. группами COOH) подробно изучено Фейтельсоном (Feitelson, 1964), Вебером и Розенек (Weber a. Rosenheck, 1964). Так как карбоксильные кислоты тушат флуоресценцию фенола, анизолa, тирозина и фенилаланина, то механизм их тушащего действия не связан с присутствием OH -группы. Ввиду того что влияние карбоксильных кислот убывает с возрастанием температуры, что оно сопровождается увеличением растворимости анизолa в воде, и что при высоких концентрациях тушителя выход стремится к постоянной величине, Вебер и Розенек (Weber a. Rosenheck, 1964) предположили, что тушение связано с образованием темнового комплекса между ароматическим ядром флуоресцирующей молекулы и кислотой.

Тушение флуоресценции остатков ароматических аминокислот в белках и синтетических полипептидах. Так как влияние рассмотренных тушащих групп происходит через OH -группу или ароматические ядра, то данные, полученные на свободных аминокислотах, по-видимому, можно распространить на аминокислотные остатки в составе молекулы белка.

Флуоресценция триптофановых остатков может тушиться в белке группами COOH и NH_3^+ — потенциальными донорами протонов. В то же время флуоресценция тирозиновых остатков тушится как донорами (группы COOH и NH_3^+), так и акцепторами протонов (группы COO^- и NH_2). По-видимому, на флуоресценцию тирозиновых остатков в белке более сильное тушащее влияние оказывают COO^- и NH_2 -группы. Это следует из экспериментов

с синтетическими сополимерами глутаминовой кислоты и тирозина (Rosenheck a. Weber, 1961; Fasman et al., 1964; Wada a. Ueno, 1964; Weber a. Rosenheck, 1964), лизина и тирозина (Pesce et al., 1964; Weber a. Rosenheck, 1964).

Ход зависимости квантового выхода сополимера — Глу—Тир — (рис. 1.4) можно объяснить следующим образом: в нейтральной среде флуоресценция тирозиновых остатков значительно потушена боковыми COO^- -группами глутаминовой кислоты; при переходе к кислым средам по мере протонизации карбоксильных групп флуоресценция тирозиновых остатков возрастает (Pesce et al., 1964; Weber a. Rosenheck, 1964). Однако ход флуориметрического титрования связан не только с протонизацией карбоксильных групп, но и со структурными превращениями сополимера, вызванными протонизацией. В нейтральной среде силы электростатического отталкивания между отрицательно заряженными COO^- -группами остатков глутаминовой кислоты препятствуют образованию спирали; в этих условиях сополимер —Глу—Тир— свернут в клубок. Протонизация COO^- -групп ведет к спирализации сополимера —L-Глу—L-Тир— и к частичной спирализации (менее 20%) сополимера —L-Глу—DL-Тир (Doty a. Gratzer, 1962). Оказалось, что в сильно кислой среде, когда все карбоксильные группы протонизированы более полно, спирализованная форма (—L-Глу—L-Тир—) имеет квантовый выход флуоресценции приблизительно в 1.2 раза больше чем деспирализованная (—L-Глу—DL-Тир—) (Fasman et al., 1964). Можно назвать несколько возможных причин этого явления: 1) повышенная жесткость спиральной формы; 2) различия полярности среды, окружающей тирозиновые остатки в спирализованной и неспирализованной формах (Fasman et al., 1964; см. стр. 47); 3) различия в доступности тирозиновых остатков для тушащих COOH -групп.

Падение квантового выхода флуоресценции сополимера —Лиз—Тир— в щелочной среде (рис. 1.4) Вебер и Розенек (Weber a. Rosenheck, 1964) связывают с тушением флуоресценции тирозиновых остатков группами NH_2 , образующимися при диссоциации NH_3^+ -групп остатков лизина,

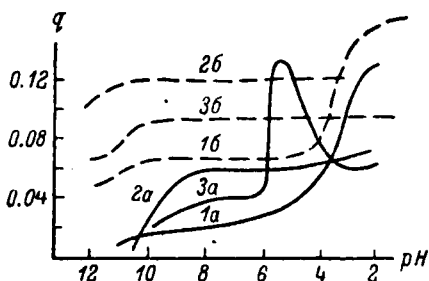


Рис. 1.4. Зависимость квантового выхода (q) сополимеров от pH среды (Weber a. Rosenheck, 1964).

1 — глутаминовая кислота—тирозин (96 : 4), 2 — лизин—тирозин (96 : 4), 3 — глутаминовая кислота—лизин—тирозин (58 : 38 : 4). а — до, б — после О-метилирования тирозиновых остатков.

Чувствительность флуоресценции ароматических остатков к состоянию ионизации боковых групп соседних с ними аминокислот была обнаружена при изучении свойств более сложной модельной системы, сополимера тирозина, лизина и глутаминовой кислоты (Rosenheck a. Weber, 1961; Weber a. Rosenheck, 1964).

Зависимость квантового выхода флуоресценции этого сополимера от pH раствора приведена на рис. 1.4. Квантовый выход резко возрастает в изоэлектрической точке. Такая зависимость квантового выхода от pH может быть объяснена тем, что в изоэлектрической точке COO^- -группы глутаминовой кислоты связываются с равным числом заряженных NH_3^+ -групп лизина и тем самым предотвращается тушащее взаимодействие COO^- -групп с OH-группами тирозина (Weber a. Rosenheck, 1964). Это предположение подтверждается отсутствием изоэлектрического максимума флуоресценции в солевом растворе и довольно высоким и постоянным значением квантового выхода для сополимера с O-метилированными тирозиновыми остатками.

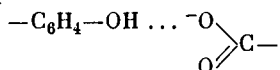
Относительное содержание тушащих amino- и карбоксильных групп в белках значительно меньше, чем в рассмотренных выше сополимерах, и поэтому их тушащее влияние не будет проявляться столь резко. Вероятность сближения ароматических колец и тушащих групп должна возрасти при возникновении вторичной и особенно третичной структур: упаковка полипептидной цепи в глобулу приводит к увеличению содержания тушащих групп в единице объема.

Ввиду того что тушащее действие amino- и карбоксильных групп зависит от состояния их ионизации, естественно ожидать, что тушащее влияние этих групп проявится при изучении зависимости квантового выхода белков от pH. Однако в щелочной среде влияние диссоциации боковых NH_3^+ -групп не проявляется, возможно, из-за того, что приблизительно в той же области pH происходит тушение флуоресценции белков за счет ионизации OH-групп тирозиновых остатков (более подробно о тушении флуоресценции белков в щелочной среде будет сказано в разделе о миграции энергии). Для триптофансодержащих белков, структура которых не нарушается в кислой среде, протонизация карбоксильных групп остатков глутаминовой и аспарагиновой кислот приводит к небольшому спаду интенсивности флуоресценции при pH ниже 5 (Steiner a. Edelhoch, 1963a).

Таким образом, боковые группы некоторых аминокислот могут вызывать тушение флуоресценции остатков ароматических аминокислот в белке. Возможно, тушащим действием обладают не только amino- и карбоксильные группы, но и другие боковые группы аминокислот в белке. Так как для тушения необходимо сближение тушащих и флуоресцирующих групп, то эффективность тушения связана со структурой белка.

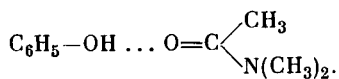
Влияние водородных связей

Предположение о том, что водородные связи между гидроксильными группами тирозиновых остатков и заряженными карбоксильными группами



тушат флуоресценцию тирозиновых остатков, было выдвинуто Тилом (Teale, 1960, 1961) и Владимировым (1961). Существование таких связей проявляется в первую очередь в аномальном ходе фотометрического титрования белков (см. обзор: McLaren a. Shugar, 1964). Тил выдвинул свое предположение на основании того, что рибонуклеаза, у которой три тирозиновых остатка из шести аномальны (вступили в водородную связь), имеет более низкий квантовый выход (1.7), чем инсулин (3.7), у которого все тирозиновые остатки титруются нормально.

Ковгилл (Cowgill, 1964b) установил, что в неполярных средах сильное тушение флуоресценции фенола, сопровождающееся также изменением спектра поглощения, вызывает диметилацетамид, и объяснил этот эффект образованием водородной связи:



При увеличении полярности среды тушение ослаблялось и совершенно отсутствовало в водном растворе. На основании этих экспериментов Ковгилл высказал предположение, что тирозиновые остатки, находящиеся в гидрофобных областях внутри макромолекулы белка, могут образовывать водородные связи не только с карбоксильными группами, но и с карбонильными группами, например, с карбонильными группами пептидных связей.

Как и следовало ожидать, исходя из представлений об образовании водородных связей между карбоксильными (или карбонильными) группами и тирозиновыми остатками, денатурация рибонуклеазы, приводящая к разрыву этих связей, вызывает возрастание выхода до 0.55 (Cowgill, 1964a). В работе Ковгилла (Cowgill, 1965a) показано, что три нормальных тирозиновых остатка нативной рибонуклеазы имеют выход 0.55, в то время три остальных вносят не более 10% в общую флуоресценцию рибонуклеазы. В настоящее время, на наш взгляд, нет оснований для более широкого обсуждения влияния водородных связей на флуоресценцию белков.

Влияние полярности окружения

При флуоресцентных исследованиях белков используются, как правило, полярные растворители (в большинстве случаев — вода). Однако полярность среды, непосредственно окружающей

хромофоры ароматических аминокислот в белке, может сильно отличаться от полярности растворителя. Причиной этого является экранировка остатков ароматических аминокислот остальной частью макромолекул от растворителя. Такая экранировка весьма существенна при наличии глобулярной третичной структуры и может существенно изменить флуоресцентные свойства триптофановых остатков в белке. Об этом свидетельствует установленный факт сильного влияния полярности среды на флуоресценцию индола (Van Duuren, 1961; Weber, 1961a; Mataga et al., 1964) и его производных (Teale, 1960; Van Duuren, 1961; Steiner et al., 1964). Экспериментальные результаты Матага и др. (Mataga et al.,

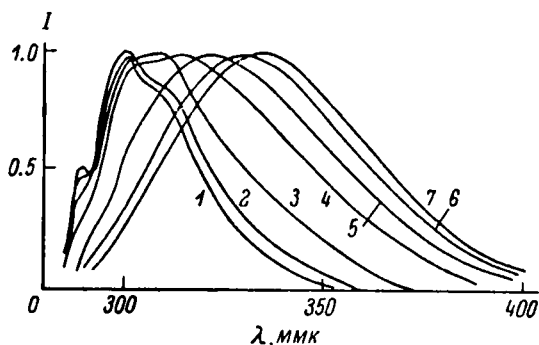


Рис. 1.5. Спектры флуоресценции индола в смеси *n*-гексана и этанола (Mataga et al., 1964).

Концентрации этанола (М): 1 — 0, 2 — 0.017, 3 — 0.085, 4 — 0.17, 5 — 0.51, 6 — 2.55, 7 — 8.52. *I* — интенсивность флуоресценции (отн. ед.).

1964) существенны для понимания электронных спектров индола, триптофана и триптофанового остатка в белке (рис. 1.5).

В неполярных средах спектр флуоресценции индола сильно структурирован и имеет основной максимум около 300 мкм. В полярных средах этот максимум исчезает, а вместо него возникает более длинноволновая неструктурированная полоса флуоресценции, сдвигающаяся в длинноволновую сторону по мере увеличения полярности среды. Объяснение, которое дают авторы этой работы изменениям спектра флуоресценции в зависимости от полярности растворителя, лучше всего иллюстрируется схемой на рис. 1.6. Спектр поглощения индола в области 250—300 мкм состоит из двух электронных полос, $A \rightarrow {}^1L_b$ и $A \rightarrow {}^1L_a$, с максимумами при 286 и 270 мкм соответственно. Спектр флуоресценции в слабополярном растворителе определяется переходом $A \rightarrow {}^1L_b$. Появление этой полосы и ее сдвиг в длинноволновую область при увеличении полярности растворителя Матага и др. (Mataga et al., 1964) объясняют большим дипольным моментом индола в возбужденном 1L_a -состоянии, что приводит к сильному взаимодей-

ствию его с полярными молекулами растворителя и уменьшению за счет этого энергии 1L_a -состояния.

Вернемся к рассмотрению влияния на флуоресценцию белка экранировки триптофановых остатков от растворителя. Такая экранировка приведет к тому, что различные триптофановые остатки в молекуле белка окажутся в среде различной полярности. При этом они будут иметь различные спектральные максимумы, как об этом можно судить по приведенным выше данным для

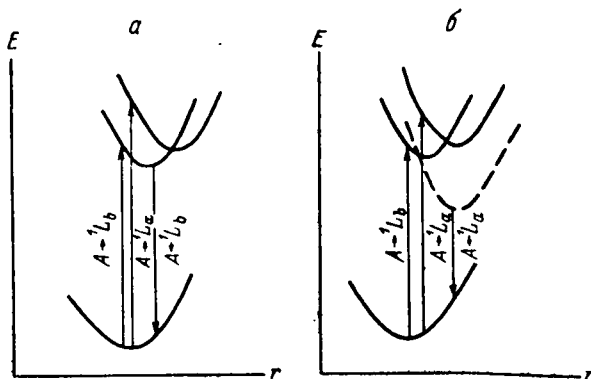


Рис. 1.6. Электронные уровни индола в неполярном (а) и в полярном (б) растворителе.

Объяснения в тексте.

индола. Таким образом, спектр каждого белка есть усреднение различных по максимуму спектров триптофановых остатков. Возможно, некоторая структурированность спектров флуоресценции триптофансодержащих белков, отмечаемая Владимировым и Бурштейном (1960), связана с наложением спектров нескольких триптофановых остатков, находящихся внутри макромолекул в условиях различной полярности.

Индивидуальность структуры, определяющая полярность окружения триптофановых остатков, должна приводить к различиям в значениях спектральных максимумов белков, что, действительно, было обнаружено на практике, например, Тилом (Teale, 1960). Так как экранировка уменьшает полярность, то спектры белков всегда сдвинуты в коротковолновую сторону по сравнению со спектром индола и триптофана* (Edelhoc h a. Steiner, 1964).

* По мнению Владимирова и Ли Чинь-го (1962), коротковолновые сдвиги флуоресценции триптофансодержащих белков и кристаллов триптофана по сравнению со свободным триптофаном в растворе имеют одинаковую природу, связанную с ограничением колебательных степеней свободы. Конкретный механизм спектрального сдвига флуоресценции белков авторы видят в образовании водородных связей между иминогруппой триптофана и соседними кислотными группами.

Обработка белков 8 М мочевиной приводит к тому, что максимумы спектров их флуоресценции становятся близки друг к другу и к максимуму спектра флуоресценции триптофана в водном растворе (Teale, 1960). Это можно связать с тем, что 8 М мочевины нарушает структуру белка и увеличивает доступность триптофановых остатков для молекул растворителя (воды), что увеличивает полярность окружения и приводит к длинноволновому сдвигу спектра (Edelhoc h a. Steiner, 1964).

В связи со сказанным, о влиянии полярности на спектры флуоресценции триптофана интересно обратиться к работе Бобровича и Конева (1964), которым удалось получить резко структурированные спектры флуоресценции кристаллической амилазы (рис. 1.7). Одно из возможных объяснений этого явления, предлагаемое авторами работы, состоит в том, что они наблюдали явление, подобное эффекту Шпольского (см. раздел 0.2).

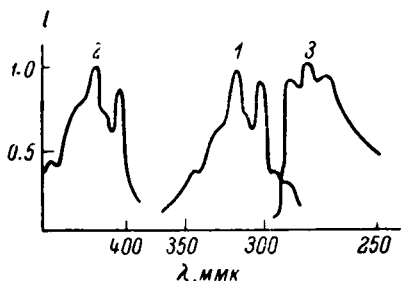


Рис. 1.7. Спектры флуоресценции (1), фосфоресценции (2) и возбуждения (3) кристаллической амилазы (Бобрович и Конев, 1964).

I — интенсивность свечения (отн. ед.).

Авторы называют несколько возможных причин появления такого спектра, связанных с различиями физико-химического окружения триптофановых остатков в кристаллической амилазе и амилазе в растворе или аморфном состоянии: изменение внутримолекулярной гидратации, тесный контакт и взаимопроникновение полипептидных цепей соседних молекул и даже обратимое изменение вторичной и третичной структуры белка при кристаллизации.

Практически ничего не известно о состоянии воды в кристаллической амилазе. Однако можно предположить, что триптофановые остатки (или часть этих остатков) оказываются в кристаллической амилазе в неполярной среде. Основанием для такого предположения могут служить рентгеноструктурные исследования Перуца, показавшие, что молекулы гемоглобина в кристалле связывают воду только на поверхности (цит. по: Eley, 1962). Тогда на основании изложенного выше о влиянии полярности среды на спектры флуоресценции индола можно предположить, что коротковолновое положение спектра флуоресценции кристаллической амилазы и его структура в значительной степени обусловлены переходом $A \leftarrow {}^1L_b$. Бобрович и Конев (1964) связывают с этим переходом лишь коротковолновые максимумы при 288 и 293 мμ. Вклад различных осцилляторов в спектр флуоресценции кристаллической амилазы можно, по-видимому, выяснить с помощью изучения поляризационных спектров флуоресценции.

Полярность среды определяет не только положение спектра флуоресценции, но также влияет на квантовый выход производных индола. По данным Тила (Teale, 1960), понижение диэлектрической постоянной среды приводит наряду со сдвигом максимума спектра флуоресценции в коротковолновую сторону к увеличению квантового выхода глицилтриптофана. Штейнер и др. (Steiner et al., 1964) отмечают, что добавки, уменьшающие диэлектрическую постоянную растворителя (пропиленгликоль, диоксан, сахара, диметилсульфоксид), приводят к возрастанию выхода флуоресценции ацетилтриптофанамида. Наоборот, глицин и глицилглицин, увеличивающие диэлектрическую постоянную, приводят к тушению флуоресценции. Исключением из этой качественной зависимости является мочеви́на (рис. 1.8).

Более противоречивы сведения о влиянии полярности среды на флуоресценцию фенола и его производных. Вебер и Розенек (Weber a. Rosenheck, 1964) указывают на то, что полярность растворителя почти не влияет на спектры и выходы флуоресценции фенола и тирозина. В то же время Вада и Йено (Wada a. Ueno, 1964) обнаружили, что квантовые выходы политирозина в этаноле, диоксане и воде относятся как 15 : 2 : 1 соответственно.

Структура белка и миграция энергии

Проблеме миграции энергии в биологических системах посвящено очень большое число работ, зачастую весьма противоречивых. Ссылки и подробный анализ результатов можно найти в ряде обзоров (Риль, 1948; Владимиров и Конев, 1957, 1959; Stryer, 1960; Тарусов, 1960; Бурштейн, 1961, 1964).

К настоящему времени установлено наличие резонансной миграции энергии в растворах (и определено расстояние R_0 — см. раздел 0.6) между молекулами фенола ($R_0=17 \text{ \AA}$), индола ($R_0=17 \text{ \AA}$), с фенола на индол ($R_0=18.5 \text{ \AA}$) (Weber, 1960a), между молекулами триптофана ($R_0=17 \text{ \AA}$) (Конев и др., 1961, 1964). В работе Вада и Йено (Wada a. Ueno, 1964) показано существование миграции в модельных системах — сополимерах тирозина

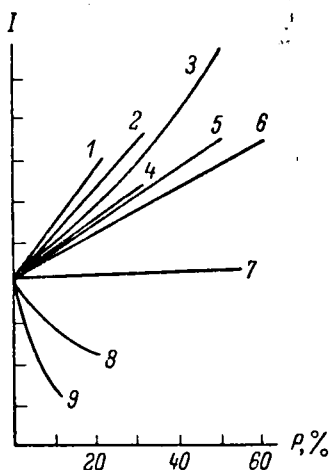


Рис. 1.8. Зависимость интенсивности флуоресценции (I) ацетилтриптофанамида в фосфатном буфере от объемной доли (ρ) различных добавок к раствору (Steiner et al., 1964).

1 — диметилсульфоксид, 2 — ацетат натрия, 3 — диоксан, 4 — хлористый калий, 5 — пропиленгликоль, 6 — мочеви́на, 7 — сахара, 8 — глицин, 9 — глицилглицин. (рН буфера — 7.0, $\lambda_{\text{возб}}$ — 290 мкм, $\lambda_{\text{фл}}$ — 350 мкм).

и триптофана. Существуют доказательства межтирозиновой (Weber, 1960b, 1961a), тирозин-триптофановой (Бобрович и Конев, 1965) и межтриптофановой (Конев и др., 1965) резонансной миграции энергии в белках. При наличии в белке простетической группы энергия может мигрировать от остатков ароматических аминокислот на простетическую группу (см., например: Владимиров и Конев, 1957, 1959).

Наконец, из экспериментов по флуорометрическому титрованию белков (Steiner a. Edelhoch, 1963a, 1963b; Cowgill, 1965b) и синтетических полипептидов (Cowgill, 1963b, 1965b; Edelhoch et al., 1963) следует, что эффективными акцепторами энергии возбуждения триптофановых и тирозиновых остатков в щелочной среде являются ионизированные тирозиновые остатки.

Должна существовать связь между процессами резонансной миграции энергии в белке и его структурой. Действительно, ввиду того что вероятность резонансной миграции при прочих равных условиях убывает пропорционально шестой степени расстояния между донором и акцептором (см. раздел 0.4), принципиальным условием миграции энергии между хромофорами ароматических остатков аминокислот в белке должна являться их пространственная близость. В свою очередь расстояние между ароматическими остатками определяется структурой белка (первичной, вторичной, третичной). Лишь специфические особенности первичной и вторичной структур могут обеспечить необходимое для резонансной миграции сближение между некоторыми ароматическими остатками. Так, например, вероятность передачи энергии к ионизированному тирозиновому остатку постепенно убывает с увеличением числа групп, разделяющих триптофановый и тирозиновый остатки в соединениях с различной первичной структурой: для соединения Три—(Гли)_n—Тир вероятность миграции составляет 0.85 при $n=0$ и 0.35 при $n=4$ (Edelhoch et al., 1963). Оптимальным условиям для миграции энергии будет соответствовать третичная структура, отвечающая наибольшей плотности упаковки аминокислотных остатков.

Возникает вопрос, нельзя ли по миграции судить о структуре и структурных превращениях микромолекулы белка. Подход к решению этого вопроса наметился в работе, в которой исследовалось влияние йодирования тирозиновых остатков на флуоресценцию инсулина, рибонуклеазы и ряда модельных соединений (Cowgill, 1965a).

На основании того, что йодированные тирозиновые остатки не флуоресцируют и являются акцепторами энергии возбуждения нейодированных остатков, было получено уравнение

$$I = I_0 \left(1 - \frac{[p]}{m[M]}\right) \left(1 - k \frac{[p]}{[M]}\right), \quad (1.1)$$

где I — интенсивность флуоресценции на разных стадиях йодирования; I_0 — интенсивность флуоресценции до йодирования;

$[p]$ — концентрация монойодированных остатков, которая равна концентрации молекул йода, так как на начальных стадиях йодирования образуется преимущественно монойодзамещенное соединение: $\text{Тир} + \text{J}_2 = \text{J}-\text{Тир} + \text{HJ}$; $[M]$ — концентрация молекул белка в растворе; m — число флуоресцирующих тирозиновых остатков на молекулу; k — эффективность миграции энергии от тирозиновых остатков к йодированным тирозиновым остаткам ($k=1$ соответствует 100% миграции, т. е. полной потере флуоресценции в присутствии одного йодированного остатка на молекулу; $k=0$ соответствует отсутствию миграции или частному случаю, когда в молекуле лишь один тирозиновый остаток).

Оказалось, что экспериментальная зависимость I от $\frac{[p]}{[M]}$ для исследованных веществ лучше всего описывается теоретической формулой (1.1) при следующих значениях m и k :

	m	k
Тир—Тир	2	0.3
Инсулин	4	0.3
Нативная рибонуклеаза *	3	0.2
Денатурированная (7.2 М мочевины) рибонуклеаза	6	0.06

Эти результаты позволяют сделать ряд важных выводов (Cowgill, 1965a): 1) одинаковые значения k для инсулина и дипептида Тир—Тир свидетельствуют о том, что в молекуле инсулина четыре тирозиновых остатка расположены очень близко друг к другу; 2) у нативной рибонуклеазы флуоресцирующими являются лишь три тирозиновых остатка из шести; 3) денатурация рибонуклеазы приводит к тому, что все шесть тирозиновых остатков становятся «нормальными» и флуоресцирующими; 4) сравнение величин k свидетельствует о пространственном разобщении тирозиновых остатков рибонуклеазы при денатурации.

Таким образом по эффективности миграции энергии можно судить о некоторых особенностях структуры белков.

* * *

Изложенный в этом параграфе материал показывает, что флуоресцентные свойства белков определяются целым рядом факторов, влияющих на флуоресцентные свойства ароматических остатков, действие которых тесно связано со структурой (первичной, вторичной, третичной) белка.**

* Предполагается, что в первую очередь происходит йодирование «нормальных» тирозиновых остатков рибонуклеазы (Donovan, 1963).

** Конев (1964) показал, что изменения четвертичной структуры приводят к изменениям флуоресценции белка. Однако в этих опытах изменения интенсивности флуоресценции могли быть вызваны изменениями вторичной и третичной структур белка, происходящими наряду с изменением четвертичной структуры.

По-видимому, на флуоресценцию остатков ароматических аминокислот в белке влияют не только рассмотренные в этом параграфе, но и другие, менее изученные факторы. Так, например, в настоящее время нет достаточного материала, для того чтобы обсуждать возможность возникновения полосы флуоресценции белка с максимумом в области 420—470 мкм, которая была обнаружена Лерером и Фасманом (Lehrer a. Fasman, 1964) для ряда синтетических полипептидов в состоянии спирали и которую они приписали эксимерам остатков ароматических аминокислот. На наш взгляд, нет также достаточных оснований для обсуждения влияния на флуоресценцию белка жесткости молекулы, обусловленной ее вторичной и третичной структурой.

1.4. ИССЛЕДОВАНИЕ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ КАК МЕТОД ИЗУЧЕНИЯ СТРУКТУРЫ И КОНФОРМАЦИОННЫХ ПЕРЕХОДОВ БЕЛКОВ

Несмотря на то что структура макромолекулы белка определяется относительным расположением больших участков макромолекулы, а ее люминесценция — свойствами небольших хромофорных центров, флуоресцентные свойства белка, как было показано в предыдущем параграфе, тесно связаны с его структурой. В этом параграфе делается попытка определить объем той информации о структуре и структурных превращениях белков, которую можно получить в настоящее время на основании изучения их ультрафиолетовой (УФ) флуоресценции.

Изменение интенсивности флуоресценции как критерий конформационных переходов. Сравнение с другими методами

В последние годы экспериментально показана высокая чувствительность интенсивности флуоресценции белковой макромолекулы к любым изменениям ее структуры. В качестве примера применения флуоресцентных методов к изучению конформационных переходов рассмотрим эксперименты, выполненные в работе Перлман (Perlman, 1964). В этой работе проводилось параллельное изучение интенсивности флуоресценции, оптического вращения и биологической активности пепсиногена (способности его превращаться в пепсин) в зависимости от температуры и концентрации мочевины. Возрастание величины оптического вращения и уменьшение интенсивности флуоресценции (рис. 1.9) происходит в одной и той же температурной области. В той же области с повышением температуры падает биологическая активность пепсиногена. Если нагревание осуществляется в присутствии мочевины, то конформационный переход наблюдается при более низкой температуре. Температуры перехода (температуры, соответ-

ствующие точкам перегиба кривых на рис. 1.9), полученные на основе измерений оптического вращения и флуоресценции, хорошо соответствуют друг другу. Таким образом, изменение всех трех характеристик отражает один и тот же конформационный переход в макромолекуле.

Однако соответствие между изменениями оптического вращения и интенсивности флуоресценции не совсем полное; охлаждение раствора пепсиногена после однократного нагревания до 60°С

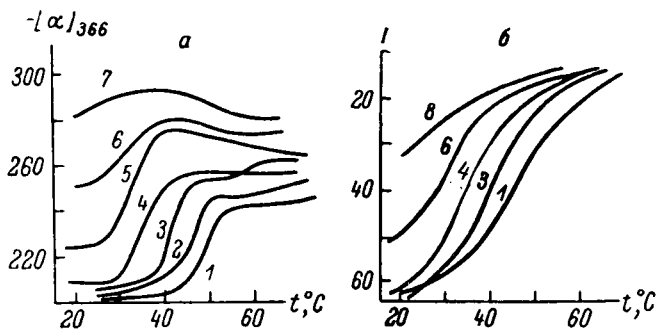


Рис. 1.9. Зависимость величины оптического вращения (а) и интенсивности флуоресценции (б) пепсиногена в растворах от температуры (Perlman, 1964).

Концентрация мочевины (М): 1 — 0.0, 2 — 0.5, 3 — 1.0, 4 — 2.0, 5 — 2.5, 6 — 3.0, 7 — 3.5, 8 — 10.

сопровождается полным восстановлением биологической активности и интенсивности флуоресценции, в то время как величина оптического вращения восстанавливается лишь частично. Многократное нагревание раствора пепсиногена с последующим охлаждением приводит к частичной потере биологической активности и уменьшению интенсивности флуоресценции. По мнению автора работы, такая взаимосвязь между интенсивностью флуоресценции и биологической активностью говорит о том, что некоторые триптофановые остатки, ответственные за флуоресценцию, расположены в активном центре молекулы пепсиногена.

В последние годы выполнены многочисленные работы (Steiner a. Edelhoch, 1961, 1962a, 1963a, 1963b; Brand et al., 1962; Edelhoch a. Steiner, 1962; Gally a. Edelman, 1962, 1964; Gerstein et al., 1963; Cowgill, 1964a; Steiner et al., 1964; Frattaly et al., 1965), в которых изучение конформационных переходов в белках с помощью люминесцентного метода сравнивалось с результатами, полученными с помощью других методов. Такое сравнение показывает, что флуоресцентные методы наряду с другими оптическими методами являются удобными и легко доступными для обнаружения и изучения конформационных переходов. Однако ввиду того что изменение структуры белков опосредованно

отражается на флуоресцентных свойствах хромофоров, в настоящее время по изменению интенсивности флуоресценции нельзя детализировать характер перехода. Развитие метода, по-видимому, позволит судить о тех локальных изменениях микроокружения остатков ароматических аминокислот внутри белковой молекулы, которые происходят в результате конформационного перехода.

*Некоторые особенности исследования
конформационных переходов
флуоресцентным методом*

Конформационные переходы белков могут быть вызваны изменением различных факторов внешней среды: температуры, рН, состава растворителя и т. д. Специфика изучения конформационных переходов флуоресцентным методом состоит в том, что факторы внешней среды, которые могут привести к изменению структуры белка, оказывают и непосредственное влияние на флуоресценцию остатков ароматических аминокислот в белке.

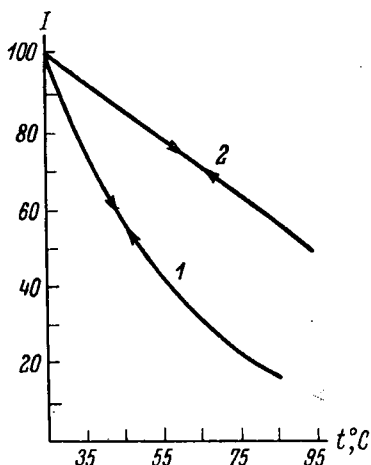


Рис. 1.10. Зависимость интенсивности флуоресценции (I) триптофана (1) и тирозина (2) от температуры (Gally а. Edelman, 1964).

Таким образом, результирующее изменение интенсивности флуоресценции в ответ на внешнее воздействие будет складываться из непосредственного влияния этого воздействия на флуоресценцию хромофора и опосредованного влияния, связанного с изменением структуры белка. В каждом частном случае вклад этих двух причин в изменение флуоресценции белка будет различен.

Рассмотрим, например, зависимость интенсивности флуоресценции белков от рН. У триптофансодержащих белков, не претерпевающих изменений структуры в кислых средах,

в этих средах наблюдается небольшой спад интенсивности флуоресценции за счет тушения ее группами COOH (Steiner а. Edelhoch, 1963a). Для тех белков, у которых в этой зоне рН другими методами были обнаружены конформационные превращения, обычный ход зависимости интенсивности флуоресценции от рН нарушается. В этом случае зависимость интенсивности флуоресценции от рН определяется двумя процессами: конформационным превращением белка и тушением COOH -группами (Steiner а. Edelhoch, 1963a). Подобно этому характер зависимости флуоресценции белков от рН в щелочной области определяется двумя факторами: влиянием

конформационных переходов и тушением за счет ионизации гидроксильных групп тирозиновых остатков (Frattaly et al., 1965).

Очень часто изменение структуры белка вызывается повышением температуры. В этом случае надо учитывать, что изменение температуры меняет флуоресцентные свойства остатков ароматических аминокислот по двум причинам. Наряду с изменением микроокружения хромофоров при конформационных изменениях имеет место чисто температурный эффект тушения (см. раздел 0.5).* Конформационные переходы белков при их нагревании приводят к нарушению монотонного хода температурного тушения, а иногда к появлению необратимости зависимости интенсивности флуоресценции от температуры (Steiner a. Edelhoch, 1962a, 1963a; Gally a. Edelman, 1962, 1964).

Таким образом, не всякое изменение флуоресценции белка отвечает конформационному переходу. Всегда необходимо учитывать влияние внешнего воздействия непосредственно на флуоресценцию остатков ароматических аминокислот белка.

* Галли и Эдельман (Gally a. Edelman, 1962, 1964) показали, что квантовый выход флуоресценции свободных аминокислот — триптофана и тирозина (рис. 1.10) — и белков, не претерпевающих конформационных переходов, монотонно уменьшается с повышением температуры.

Схема процессов, объясняющих температурное тушение флуоресценции, рассмотрена во введении (раздел 0.5). Галли и Эдельман (Gally a. Edelman, 1962) путем простых преобразований получили из (0.7) уравнение, приведенное ниже в несколько измененном виде:

$$\ln \left[\frac{d \left(-\frac{1}{q} \right)}{d \left(\frac{1}{T} \right)} \right] = \ln \left(\frac{k_3 E}{k_1} \right) - \frac{\Delta E}{RT}. \quad (1.2)$$

Из экспериментальной зависимости q от T и последующего графического анализа уравнения (1.2) Галли и Эдельман определили для триптофана и тирозина величины ΔE , $\frac{k_3}{k_1}$ и $\frac{k_2}{k_1}$ (см. стр. 24):

	ΔE (ккал/моль)	$\frac{k_3}{k_1}$	$\frac{k_2}{k_1}$
Три	8.1	$2.2 \cdot 10^6$	1.3
Тир	7.1	$4.3 \cdot 10^5$	0.9

Линейная зависимость $\ln \left[\frac{d \left(-\frac{1}{q} \right)}{d \left(\frac{1}{T} \right)} \right]$ от $1/T$ (чисто температурный эффект тушения)

обнаружена также при исследовании ряда пептидов, содержащих тирозин и (или) триптофан, а из группы исследованных белков только для лизоцима (Gally a. Edelman, 1964). Из этого следует, что включение ароматических аминокислот в полипептидную цепь (т. е. первичная структура белка) не оказывает существенного влияния на ход температурного тушения. Последующие структуры также не влияют на физический механизм температурного тушения, однако изменение этих структур от температуры, меняя окружение ароматических остатков, создает в эксперименте сложный ход температурной зависимости флуоресценции.

*Изучение кинетики
конформационных переходов
и определение термодинамических
характеристик*

В ряде работ (Cowgill, 1964a; Steiner et al., 1964; Edelhoch et al., 1965) было проведено изучение временной зависимости интенсивности флуоресценции при осуществлении конформационного перехода. Во всех исследованных случаях эта зависимость хорошо соответствует уравнению реакции первого порядка (рис. 1.11) :

$$\frac{1}{t} \ln \frac{I - I_{\infty}}{I_0 - I_{\infty}} = k, \quad (1.3)$$

где I_0 , I и I_{∞} — относительная интенсивность флуоресценции в начальный момент времени, в момент времени t и по достижении равновесия соответственно, k — константа скорости реакции первого порядка.

Величины k , определенные таким образом, хорошо соответствуют значениям, полученным методами оптического вращения, разностного спектра поглощения и др. На рис. 1.12 приведена, например, зависимость константы скорости реакции денатурации пепсиногена от концентрации мочевины, полученная различными методами.

Изучение зависимости k от температуры позволяет определять термодинамические параметры конформационного перехода и энергию активации. Энергия активации E^* связана с константой реакции уравнением Аррениуса:

$$\frac{d \ln k}{dT} = \frac{E^*}{RT^2}, \quad (1.4)$$

где T — абсолютная температура, R — газовая постоянная. Интегрируя уравнение (1.3), получаем

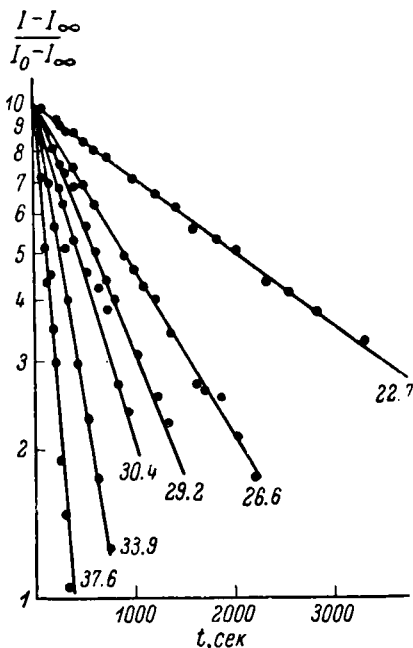


Рис. 1.11. Зависимость величины $\frac{I - I_{\infty}}{I_0 - I_{\infty}}$ от времени (t) при денатурации пепсиногена мочевиной в буферном растворе при различных температурах (Edelhoch et al., 1965).

По оси абсцисс — время, прошедшее с момента добавления мочевины (сек.), по оси ординат — значения $\frac{I - I_{\infty}}{I_0 - I_{\infty}}$ (шкала логарифмическая). I_0 — относительная интенсивность флуоресценции в начальный момент времени, I — то же в момент времени t , I_{∞} — то же по достижении равновесия. Цифры около кривых — температура ($^{\circ}\text{C}$); концентрация мочевины — 5.0 М.

$$\ln k = -\frac{E^*}{RT} + c. \quad (1.5)$$

По наклону кривой зависимости $\ln k$ от $\frac{1}{T}$ можно определить величину E^* .

Свободная энергия активации (ΔF^*) рассчитывается из уравнения

$$k = \frac{k'T}{h} e^{-\frac{\Delta F^*}{RT}}, \quad (1.6)$$

где h — постоянные Планка, k' — постоянная Больцмана. Учитывая, что

$$\Delta F^* = \Delta H^* - T\Delta S^*, \quad (1.7)$$

где ΔH^* — энтальпия, ΔS^* — энтропия активации, и что

$$\Delta H^* = E^* - RT, \quad (1.8)$$

можно рассчитать ΔH^* и ΔS^* .

В работе Эдельхоха и др. (Edelhoc et al., 1965) определены таким образом термодинамические параметры денатурации пепсиногена мочевиной (табл. 1.3).

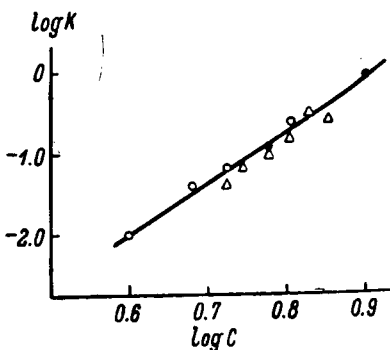


Рис. 1. 12. Зависимость константы первого порядка (K) реакции денатурации пепсиногена при 25°C от концентрации (C) мочевины (Edelhoc et al., 1965).

По оси абсцисс — логарифм концентрации (M), по оси ординат — логарифм K . Светлые кружки — данные, полученные при изучении разностных УФ спектров поглощения, темные кружки — при изучении флуоресценции, треугольники — при изучении оптического вращения.

Определение некоторых особенностей структуры белковой молекулы с помощью веществ, влияющих на выход флуоресценции ароматических остатков

Ароматическим аминокислотам в составе белковой молекулы, в первую очередь триптофану и тирозину, часто приписывается особая роль как в поддержании структуры белка (третичной и четвертичной), так и в работе активных центров самых различных ферментов (см., например, обзор: Бурштейн, 1964). Способность ароматических аминокислот образовывать комплексы с переносом заряда (см. обзор: Pullman a. Pullman, 1963) может также рассматриваться как потенциальная возможность этих аминокислот или их метаболитов играть особую роль во взаимодействиях типа «белок—белок». По отношению к триптофану, в частности, такое соображение было высказано еще в 1960 г. Сент-Дьердьи (Szent-Györgyi, 1960). Известна также доминирующая роль ароматических аминокислот в начальных этапах фотохимической деструк-

Таблица 1.3

ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ АКТИВАЦИИ ДЕНАТУРАЦИИ
ПЕПСИНОГЕНА МОЧЕВИНОЙ, ПОЛУЧЕННЫЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫМ
МЕТОДОМ

(Edelchoch et al., 1965)

Концентрация мочевины (М)	pH	T (°K)	ΔH^* (ккал.)	ΔF^* (ккал.)	ΔS^* (энтр. ед.)
5.0	6.68	23—37	37.0	23.0—21.9	48.0
5.0	6.97	23—38	34.7	22.0—21.4	42.9
6.0	6.20	32—43	51.4	23.2—22.2	92.3
6.0	6.38	29—40	44.5	22.5—22.0	71.9
6.0	6.52	26—39	40.4	22.4—21.7	60.1
6.0	6.59	23—38	37.0	22.1—21.6	49.5
6.0	6.80	22—35	28.3	21.7—21.4	22.5
6.0	7.05	19—35	27.8	21.2—20.9	22.6
6.0	7.18	14—27	27.3	21.2—20.9	21.4
7.0	6.52	24—36	32.8	21.7—21.3	37.1
7.0	6.86	17—33	25.9	20.9—20.6	17.5

ции самых различных белков (Владимиров, 1965). О важной роли ароматических остатков в белках свидетельствует обнаруженный в ряде работ параллелизм изменения биологической активности белков и их флуоресценции при конформационных переходах (Thorne a. Kaplan, 1963; Wang Shu-Fang et al., 1963; Perlman, 1964).

В связи с подобными представлениями возникает интерес к изучению местоположения, своего рода «топографии» триптофановых и тирозиновых остатков в белковой молекуле: доступны ли эти остатки для растворителя (или субстрата) или они находятся в малодоступных, гидрофобных частях белковой молекулы?

Очевидно, что флуоресценция остатков ароматических аминокислот в белке будет тушиться при введении в раствор молекул тушителя, способных к проникновению вместе с растворителем к индольному или фенольному кольцам. Перечень веществ, способных тушить флуоресценцию триптофана и тирозина в растворе, достаточно велик (см., например, стр. 40). Можно ожидать, что многие из этих веществ будут тушить и флуоресценцию остатков тирозина и триптофана в белках. В качестве тушителей флуоресценции белков использовались йодистый калий (Владимиров, 1957) и кислород (Баренбойм, 1963). При тушении йодистым калием интенсивность флуоресценции падает при увеличении концентрации тушителя только до определенной величины, которая, по-видимому, определяется флуоресценцией триптофановых остатков, находящихся в гидрофобных областях и недоступных для тушителя. При тушении флуоресценции кислородом скорости тушения для триптофана в растворе и для самых различных молекул белка были близки (табл. 3.2) — это говорит о большой

проницаемости белковой молекулы для молекулярного кислорода. В то же время лиофильно высушенные и кристаллические белки тушились хуже, чем растворы белков, по-видимому, из-за меньшей доступности триптофановых остатков для кислорода.

Сравнение результатов тушения флуоресценции белков йодистым калием и кислородом показывает важность подбора молекулярных размеров тушителя для определения «топографии» ароматических остатков: «оптимальный» тушитель должен проникать туда, куда проникают молекулы воды, и не должен проникать в гидрофобные области. В этом случае можно ожидать, что при тушении в спектре флуоресценции белка должна резко проявиться коротковолновая компонента, обусловленная флуоресценцией триптофановых остатков в гидрофобном окружении. Кроме того, в случае оптимального подбора тушителя денатурация белка, приводящая к увеличению доступности триптофановых остатков для растворителя, должна изменить ход зависимости $\frac{I_0}{I}$ от C (где I_0 — интенсивность флуоресценции в отсутствие тушителя, I — то же в присутствии тушителя в концентрации C) за счет изменения квантового выхода триптофановых остатков, перешедших из гидрофобного в гидрофильное окружение. Это явление может служить своего рода «индикатором» конформационного перехода, хотя подобные исследования с применением классических тушителей люминесценции пока не проводились.

В работе Штейнера и др. (Steiner et al., 1964) предложен несколько иной метод оценки доступности триптофановых остатков для растворителя, основанный на зависимости интенсивности флуоресценции от состава растворителя. В работе было показано, что относительная интенсивность флуоресценции ацетилтриптофан-амида (АТА) * находится в прямой зависимости от объемной доли различных добавок к буферному раствору при рН 7 (рис. 1.8). Затем было исследовано влияние одной из этих добавок — пропиленгликоля ** — на интенсивность флуоресценции белков.

Оказалось, что зависимость относительной интенсивности флуоресценции от объемной доли пропиленгликоля для белков с нарушенной вторичной и третичной структурой совпадает с зависимостью для АТА *** (рис. 1.13). Таким образом, влияние пропиленгликоля на флуоресценцию триптофановых остатков макромолекулы белка не зависит от ее первичной структуры.

* У АТА блокированы amino- и карбоксильные группы триптофана, что позволяет рассматривать АТА, как соединение, моделирующее в какой-то мере флуоресцентные свойства триптофанового остатка в белках.

** Пропиленгликоль был выбран потому, что его присутствие в водном растворе в небольших количествах не оказывает заметного влияния на структуру макромолекулы белка (Herskovits a. Laskowski, 1962).

*** Следует заметить, что присутствие денатурирующего агента, например мочевины, не изменяет зависимости относительной интенсивности флуоресценции АТА от содержания пропиленгликоля (рис. 1.13).

Наклон кривых зависимости интенсивности флуоресценции от объемной доли пропиленгликоля (dl/dp) оказался индивидуальным свойством нативных белков. Величина dl/dp для нативных белков всегда меньше, чем для АТА (рис. 1.13). Денатурация белков мочевиной приводит к возрастанию величины dl/dp , т. е. к усилению влияния растворителя на флуоресценцию триптофановых остатков (рис. 1.14). Эти эксперименты привели авторов

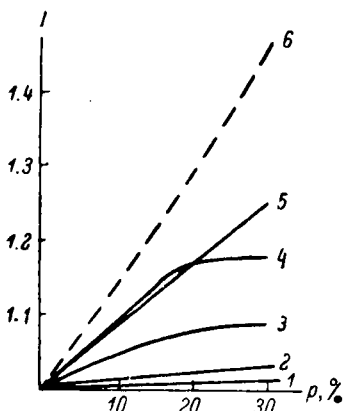


Рис. 1. 13. Зависимость относительной интенсивности флуоресценции (I) некоторых нативных белков и ацетилтриптофанамида от объемной доли пропиленгликоля (p) в растворе (Steiner et al., 1964).

1 — пепсиноген, 2 — сывороточный альбумин свиньи, 3 — пепсин, 4 — лизоцим, 5 — ингибитор трипсина из соевых бобов, 6 — ацетилтриптофанамида в водном растворе и в 7 М мочеvine, сывороточный альбумин свиньи в 8 М мочеvine и тироглобулин, обработанный трипсином в 7 М мочеvine. (Кривые приблизительно совпадают).

цитируемой работы к выводу о том, что влияние нейтральных растворителей на флуоресценцию триптофановых остатков белка всецело зависит от природы вторичной и третичной структуры макромолекулы, а наклон кривых определяется доступностью триптофановых остатков для растворителя. С этой точки зрения триптофановые остатки пепсиногена, альбумина, пепсина менее доступны для растворителя, чем у лизоцима или ингибитора трипсина из соевых бобов (рис. 1.13). Денатурация белков мочевиной приводит к более открытой, доступной для растворителя структуре.

Для такого белка, как ингибитор трипсина, выделенного из соевых бобов, наблюдается почти линейное возрастание интенсивности флуоресценции с увеличением концентрации мочевины в растворе (Edelhoc a. Steiner, 1963). Это соответствует тому факту, что мочевиная вплоть до концентрации 9 М не приводит к существенным нарушениям структуры этого белка (Edelhoc a. Steiner, 1963).

По-видимому, линейность зависимости интенсивности флуоресценции от концентрации добавки к раствору белка может служить критерием того, что в этом диапазоне концентраций добавка является для белка нейтральной. Нарушение линейной зависимости интенсивности флуоресценции от концентрации пропиленгликоля для растворов пепсина и лизоцима (рис. 1.14), по-видимому, свидетельствует о том, что по достижении соответствующих концентраций пропиленгликоль перестает быть нейтральным растворителем для этих белков.

Эксперименты, выполненные Штейнером и др. (Steiner et al., 1964), дают основание считать, что в ряде случаев изменения

величины $dI/d\rho$ в ходе конформационного перехода могут более непосредственно отражать структурные перестройки макромолекулы, чем само изменение интенсивности флуоресценции. Так, изменения интенсивности флуоресценции белков при воздействии на них мочевиной носят очень сложный характер (рис. 1.15) и представляют значительные трудности для интерпретации. Влияние мочевины на флуоресценцию белков определяется не только структурными перестройками макромолекулы, но также непосредственным влиянием ее на флуоресценцию триптофановых остатков (рис. 1.8) и теми изменениями в окружении триптофановых остатков, которые возникают при взаимодействии мочевины с различными группами полипептидной цепи. Вычленить в этом случае влияние структурных перестроек белка на его флуоресценцию вряд ли возможно. В связи с этим преимущество величины $dI/d\rho$ как критерия структурных перестроек макромолекулы состоит в том, что влияние нейтральных добавок целиком (или почти целиком) определяется структурой макромолекулы (вторичной и третичной) и не зависит от присутствия денатурирующего агента (например, мочевины).

* * *

Рассмотренные в этом параграфе данные показывают, что флуоресценция белка исключительно чувствительна к изменениям структуры белковой макромолекулы. Использование собственной флуоресценции белка для изучения его конформационных переходов позволяет: 1) обнаруживать конформационные переходы и определять условия, при которых эти переходы осуществляются (температура перехода, критическое значение рН и т. п.); 2) судить об обратимости переходов; 3) изучать кинетику переходов; 4) определять термодинамические параметры активации конформационных переходов; 5) оценивать доступность остатков ароматических аминокислот белка для растворителя (гидрофобность или гидрофильность окружения) и следить за ее изменением в ходе конформационных переходов.

В некоторых случаях можно следить за изменением интенсивности флуоресценции белков непосредственно в ходе фермент—суб-

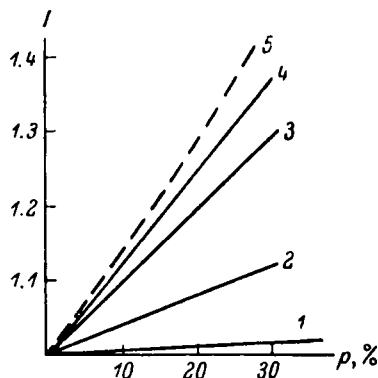


Рис. 1.14. Зависимость относительной интенсивности флуоресценции (I) тироглобулина от объемной доли пропиленгликоля (ρ) в растворе (Steiner et al., 1964).

1 — в отсутствие денатурирующего агента, 2 — в 3 М мочевины, 3 — в 7 М мочевины, 4 — в 0.02 М растворе натриевой соли додецилсульфата, 5 — в 9 М мочевины (совпадает с зависимостью для АТА).

стратной реакции (Бурштейн, 1961; Sturtevant, 1962; Бурштейн и Суслова, 1964).

Флуоресцентный метод позволяет работать с очень малыми количествами вещества. В рассмотренной выше работе Перлман (Perlman, 1964) для изучения оптического вращения использовались растворы пепсиногена с концентрацией 1%, а для флуоресцентных исследований — с концентрацией 0.025%. В случае необходимости при флуоресцентных измерениях можно использовать растворы с еще более низкой концентрацией белка. Кроме того, флуоресцентные исследования можно проводить с очень небольшими количествами раствора. Таким образом, для исследования конформационных переходов в белках с помощью флуоресцентного метода достаточно в несколько тысяч раз меньшие количества вещества, чем при применении других методов (и, в частности, метода оптического вращения). Практическая безынерционность измерения флуоресценции и возможность использования малых концентраций веществ делает флуоресцентный метод удобным для изучения кинетики процессов денатурации и ренатурации белковых макромолекул. И, наконец, несомненным преимуществом флуоресцентного метода является возможность изучения структурных перестроек белковых молекул непосредственно на живых клетках и тканях. Примером такого исследования может служить работа Штранкфельд (1964в), в которой флуоресцентным методом изучались структурные перестройки, происходящие в мышечной ткани при повышении температуры.

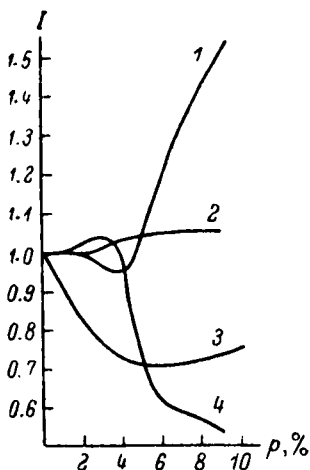


Рис. 1.15. Зависимость относительной интенсивности флуоресценции (I) белков от объемной доли (p) мочевины в растворе (Steiner et al., 1964).

1 — тироглобулин, 2 — пепсиноген, 3 — лизоцим, 4 — сывороточный альбумин человека.

1.5. ПОЛЯРИЗАЦИЯ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ АРОМАТИЧЕСКИХ АМИНОКИСЛОТ И БЕЛКОВ

Одним из методов исследования свойств макромолекул белка в растворе служит изучение поляризации флуоресценции их комплексов с красителями (Steiner a. Edelhoch, 1962b), в которых флуоресцирует краситель. Мы остановимся на сравнительно менее изученном явлении — поляризации собственной УФ флуоресценции белков. Это явление может использоваться для изучения электронной структуры хромофоров, для определения моле-

кулярного объема низкомолекулярных белков, для идентификации некоторых белков, для наблюдения за структурными изменениями и для изучения процессов миграции энергии.

Изучение электронной структуры хромофоров

Для изучения осцилляторной природы остатков ароматических аминокислот белка следует рассмотреть поляризационные спектры свободных аминокислот. Не останавливаясь на подробностях интерпретации этих спектров, мы дадим лишь сводку основных результатов об электронной структуре аминокислот, полученных на основании поляризации их флуоресценции.

Индол и триптофан. Поляризационные спектры по поглощению растворов индола и триптофана в пропиленгликоле при -70°C показаны на рис. 1.16. Для объяснения этих спектров Вебер (Weber, 1960а, 1961а) предположил, что длинноволновая полоса поглощения индола и триптофана образована двумя электронными переходами, которые отвечают двум осцилляторам, 1L_a и 1L_b (рис. 1.6). Эти осцилляторы лежат в плоскости молекулы и ориентированы друг относительно друга под углом, близким к 90° . Полоса поглощения осциллятора 1L_b лежит внутри полосы поглощения осциллятора 1L_a . Осциллятор 1L_b не высвечивает сам, а передает энергию возбуждения осциллятору 1L_a , ответственному за флуоресценцию, что и определяет «провал» в поляризационном спектре в области 270—300 мкм, где поглощают оба осциллятора. При длине волны возбуждающего света 289 мкм, где вклад осциллятора 1L_b в спектр поглощения максимален, наблюдается максимальная деполаризация флуоресценции. Представление Вебера об участии в спектре поглощения триптофана двух осцилляторов нашло подтверждение в ряде более поздних работ по исследованию поляризации флуоресценции триптофана в пленках поливинилового спирта (Севченко и др., 1963; Черницкий и др., 1963; Черницкий и Конев, 1965).

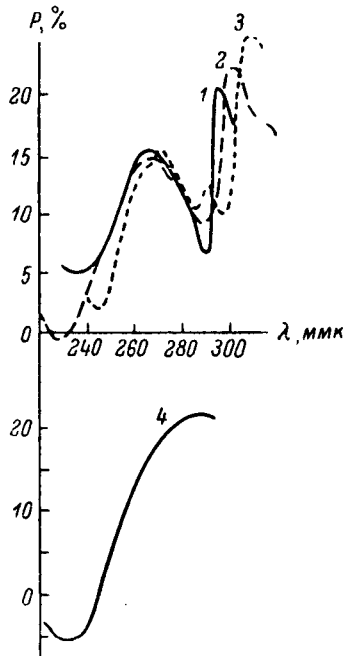
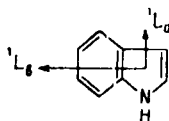


Рис. 1.16. Поляризационные спектры индола (1), триптофана (2), N-глицилтриптофана (3) и тирозина (4) в пропиленгликоле при -70°C (Weber, 1960а).

P — степень поляризации (%).

Однако предположение Вебера о том, что спектр флуоресценции определяется исключительно осциллятором 1L_a , оказалось неверным: осциллятор 1L_b может сам высвечивать в коротковолновой части спектра флуоресценции (Zimmerman а. Joop, 1961; Черницкий и др., 1963). Этот вывод был сделан на основании того, что степень поляризации падает в коротковолновой части спектра флуоресценции (Zimmerman а. Joop, 1961), а также на основании того, что поляризационный спектр по поглощению изменяет свой вид при регистрации флуоресценции в коротковолновой части спектра (Черницкий и др., 1963). Таким образом, в пленках поливинилового спирта осциллятор 1L_b большую часть энергии передает осциллятору 1L_a , но частично высвечивает и сам (Черницкий и др., 1963).

Эксперименты по изучению поляризационных спектров индола и триптофана в изотропных и анизотропных пленках поливинилового спирта позволили не только определить ориентацию осцилляторов относительно направления растяжения пленки (Севченко и др., 1963), но и относительно осей молекулы (Черницкий и Конев, 1965). Оказалось, что осциллятор 1L_b направлен вдоль длинной оси молекулы, а осциллятор 1L_a составляет с осциллятором 1L_b угол меньше 90° .



В растянутых пленках поливинилового спирта параллельно направлению растяжения устанавливается осциллятор 1L_a .

Менее изучен вопрос об осцилляторной природе фосфоресценции индола и триптофана. Черницкий и Конев (1965) склонны считать, что фосфоресценция определяется переходом $A \leftarrow {}^3L_a$. Как на один из аргументов в пользу этого предположения они указывают на совпадение формы спектров флуоресценции и фосфоресценции кристаллической амилазы (Бобрович и Конев, 1964). Однако, как уже говорилось выше, вызывает некоторые сомнения само утверждение, что спектр флуоресценции кристаллической амилазы обусловлен переходом $A \leftarrow {}^1L_a$. По данным Черницкого и Конева (1965), осциллятор фосфоресценции направлен почти перпендикулярно плоскости молекулы и имеет составляющую вдоль длинной оси молекулы (т. е. вдоль осциллятора 1L_b).

Фенол и тирозин. Растворы фенола и тирозина обнаруживают одинаковый поляризационный спектр (рис. 1.16). Анализ этого спектра позволил Веберу (Weber, 1960a) прийти к заключению, что за спектр поглощения тирозина (фенола) ответственны два перехода с максимумами при 235 и 275 мкм, осцилляторы которых лежат в плоскости молекулы и ориентированы друг относительно друга под углом, близким к прямому.

Таким образом, изучение поляризационных спектров флуоресценции позволило в основном разобраться в природе спектров ароматических аминокислот. На наш взгляд, большим пробелом в исследованиях поляризационных спектров флуоресценции индола и триптофана является отсутствие сколько-нибудь систематических данных о влиянии на эти спектры полярности среды. Такие исследования позволили бы оценить вклад осцилляторов 1L_a и 1L_b в спектры флуоресценции в средах разной полярности, что в свою очередь важно для понимания флуоресцентных свойств триптофановых остатков белка вообще и, в частности, для понимания поляризационных спектров триптофансодержащих белков.

Близкое сходство поляризационных спектров флуоресценции индола и триптофана указывает на то, что появление заместителя у индольного кольца не изменяет его осцилляторных свойств и позволяет предполагать, что эти свойства существенно не изменяются при включении триптофана в полипептидную цепь.

Поляризационные спектры белков

Поляризационные спектры глобулярных белков исследованы Вебером (Weber, 1960a, 1961a). Было обнаружено, что поляризационные спектры триптофансодержащих белков сходны по форме со спектрами свободного триптофана (индола) в растворе. Однако эти спектры имеют и некоторые особенности, как общие для всех белков этого класса, так и весьма специфичные, присущие лишь данному белку (рис. 1.17). В поляризационных спектрах большинства триптофансодержащих белков был обнаружен дополнительный (по сравнению со спектрами индола и триптофана) узкий пик с максимумом при 290 мкм. Наиболее сильно он проявляется у лизоцима, меньше у альбуминов и совсем не обнаруживается у овальбумина. Существование этого дополнительного пика также и в поляризационном спектре N-глицилтриптофана позволило Веберу предположить, что присутствие этого пика связано с наличием пептидной связи.

Общей чертой поляризационных спектров белков является большая деполяризация флуоресценции по сравнению со свободными аминокислотами. Особенно сильно деполяризована флуоресценция белков в области 270 мкм. Оказалось, что отношение степеней поляризации при 305 и 270 мкм (P_{305}/P_{270}) является величиной, характерной для каждого белка, и зависит от его структуры (Weber, 1960a, 1961a). Для индола, триптофана и N-глицилтриптофана это отношение равно 1.4—1.7, для белков в водном растворе при комнатной температуре — 1.8—2.5, а в смеси пропиленгликоль—вода (1 : 1) при -70°C — 2.2—3.0.

Однозначной интерпретации поляризационных спектров трип-

тофансодержащих глобулярных белков не существует. По мнению Вебера, различия поляризационных спектров триптофансодержащих белков и свободного триптофана в растворе определяются включением триптофана в полипептидную цепь и особенностями микроокружения триптофановых остатков в макромолекуле белка. Конев и др. (1965), не отрицая возможного влияния структуры

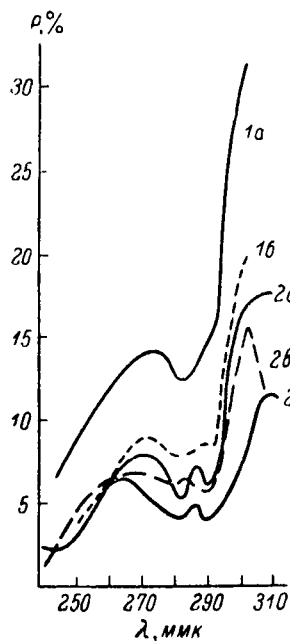


Рис. 1.17. Поляризационные спектры белков.

1 — при возбуждении поляризованным светом (Бобрович и Конев, 1965): а — сывороточный альбумин человека, б — химотрипсиноген. 2 — спонтанная поляризация (Weber, 1960b): а — сывороточный альбумин человека, б — то же для денатурированного 8 М мочевиной, в — пепсин. Р — степень поляризации (%).

белка на осцилляторную природу триптофановых остатков, считают, что деполаризация флуоресценции белков обусловлена в основном процессами резонансной межтриптофановой миграции энергии. На наш взгляд, влияние структуры может быть весьма существенным, так как следует учитывать экранировку триптофановых остатков от растворителя. Как было рассмотрено выше, такая экранировка может изменить полярность среды, окружающей триптофановые остатки, и тем самым изменить вклад осцилляторов 1L_a и 1L_b в спектры флуоресценции и поглощения. Возможно, именно с уменьшением полярности среды связано увеличение отношения P_{305}/P_{270} в ряду: свободная аминокислота — белок в воде — белок в смеси пропиленгликоля с водой. С этим предположением согласуется и обнаруженное Вебером (Weber, 1960a, 1961a) уменьшение величины P_{305}/P_{270} до 1.4—1.9 при денатурации белков мочевиной.

Влияние структуры белковой молекулы на поляризацию люминесценции было обнаружено при исследовании поляризации люминесценции фибриллярных белков (Конев и Катибников, 1961), структура которых изменяется при растяжении. Люминесценция хаотически распределенных волокон кератина шерсти и фиброина шелка сильно деполаризована. Растяжение волокон вызывает резкое возрастание степени поляризации флуоресценции. Та-

ким образом, поляризация флуоресценции чувствительна к строению белков рассматриваемого класса и может использоваться для наблюдения за изменением конформации белков.

Поляризационные спектры белков, несодержащих триптофан, сходны по форме со спектрами фенола и тирозина и отличаются от них лишь более низким абсолютным значением степени поляризации по всему спектру (Weber, 1960a).

Таким образом, в настоящее время интерпретация поляризационных спектров белков еще не является однозначной. Тем не менее поляризационные спектры флуоресценции являются индивидуальными и весьма характерными для различных триптофансодержащих белков. Они весьма чувствительны к изменениям структуры белков. В будущем, возможно, удастся установить корреляцию между различиями в поляризационных спектрах и структурными особенностями белков.

Изучение поляризации флуоресценции комплексов белков с красителями используется для определения размеров макромолекул белков. Поэтому естественно задать вопрос: нельзя ли использовать для этих целей регистрацию собственной УФ флуоресценции белков? Молекулярный объем флуоресцирующей молекулы v определяется на основании формулы Перрена (0.5) по экспериментально полученной зависимости $\frac{1}{P}$ от $\frac{T}{\eta}$, если известно время жизни возбужденного состояния τ . Подавляющее большинство белков имеет столь большие размеры, что время их вращательной релаксации (даже в маловязких, например, водных растворах при комнатной температуре) очень велико по сравнению со временем жизни возбужденного состояния остатков ароматических аминокислот. При этом степень поляризации практически не зависит от вязкости и температуры и не может дать информации об объеме макромолекулы.

Однако на основе изучения поляризации УФ флуоресценции можно определять молекулярный объем тирозин- и триптофансодержащих полипептидов с молекулярным весом, не превышающим нескольких тысяч (Weber, 1960a).

Изучение поляризации флуоресценции дает также информацию о процессах миграции энергии. Ввиду того что вопрос о миграции энергии был рассмотрен ранее (стр. 47), мы здесь на нем не останавливаемся. Заметим, что большая часть данных о резонансной миграции энергии возбуждения между ароматическими аминокислотами в растворе и между остатками ароматических аминокислот в белках получена на основе изучения поляризации флуоресценции.

1.6. УЛЬТРАФИОЛЕТОВАЯ ФЛУОРЕСЦЕНЦИЯ КЛЕТОК

Изучение УФ флуоресценции клеток проводится сравнительно недавно: это свечение было впервые обнаружено Е. М. Брумбергом с помощью специального микроскопа с оптикой, прозрачной для УФ света (Брумберг, 1956). Клетки, находившиеся под объективом этого микроскопа, фотографировались в лучах собственной УФ флуоресценции. Применение фотоэлектроники для регистрации УФ флуоресценции клеток (Агроскин и Королев, 1961;

Баренбойм и др., 1962; Агроскин и др., 1964) еще больше расширило возможности изучения этого явления. Было установлено, что с помощью УФ флуоресцентной микроскопии можно получить ценную информацию о различных процессах жизнедеятельности клеток животного и растительного мира в норме и патологии (см. обзоры: Мейсель и др., 1961; Трошин и Баренбойм, 1963; Барский, 1964; Е. Брумберг и др., 1964; Черногрядская, Пильщик и др., 1964а, 1964б).

Общая характеристика ультрафиолетовой флуоресценции клеток

При возбуждении в области 250—300 мкм (в спектре возбуждения $\lambda_{\max}=280$ мкм) флуоресцируют в ультрафиолетовой области большинство исследованных в норме и патологии клеток

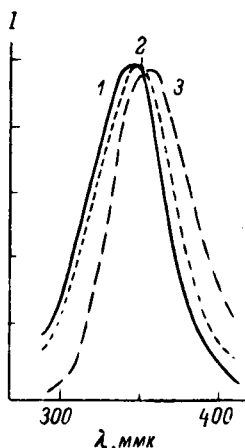


Рис. 1.18. Спектры флуоресценции лейкоцитов (1), сывороточного альбумина (2) и триптофана (3).

I — интенсивность флуоресценции (отн. ед.).

и тканей человека, животных (см. обзор: Черногрядская, Пильщик и др., 1964б) и растений (Барский и др., 1959). Флуоресцируют также бактерии (Агроскин и Барский, 1961; Е. Брумберг и Барский, 1961; Помощникова и Агроскин, 1961; Агроскин и Помощникова, 1962) и, по нашим данным, бактериофаги.

Спектры флуоресценции большинства исследованных клеток и тканей имеют одну полосу в длинноволновой УФ области с максимумом при 330—350 мкм, соответствующем по положению максимумам триптофана и триптофансодержащих белков (рис. 1.18). Точное положение максимумов полос флуоресценции у разных клеток и тканей несколько различно.

Интенсивность флуоресценции меняется в зависимости от объекта и его функционального состояния. По сравнительным данным Черногрядской, Пильщик и др. (1964б) наиболее ярко флуоресцируют мышцы и клетки эпителиальных тканей, слабее — нервные волокна и клетки крови. У некоторых клеток флуоресценция не обнаружена. Среди них — ретикулоциты и эритроциты периферической крови (Е. Брумберг, Барский и др., 1960).

Флуоресцентные методы исследования клеток могут дать наибольшую информацию, если точно установить, какие клеточные структуры и какие молекулы этих структур ответственны за флуоресценцию клеток. Поэтому именно к этим вопросам было привлечено особое внимание исследователей.

Флуоресценция отдельных клеточных структур

В клетках наиболее ярко флуоресцирует цитоплазма (Е. Брумберг, Барский и др., 1961; Черноградская, Пильщик и др., 1964б), хотя можно наблюдать и слабую флуоресценцию ядер как в клетке (Е. Брумберг и Барский, 1961; В. Барский и др., 1962; Хрущев, 1963), так и выделенных из нее (Баренбойм и др., 1963; Конев, Лыскова и Бобрович, 1963; Конев и Бобрович, 1965). В ядрах клеток слюнных желез личинок хирономид Е. Брумбергу и Барскому (1960, 1961) удалось зарегистрировать свечение хромосом, хотя в клетках других организмов свечение хромосом обнаружить не удалось (Е. Брумберг, Мейсель и др., 1961; Черноградская и Шудель, 1962а). По сравнению со слабым свечением ядра заметной является УФ флуоресценция ядрышка (Хрущев, 1963; Е. Брумберг и др., 1964). В цитоплазме с наибольшей интенсивностью флуоресцируют митохондрии (рис. 1.19), что было показано как на целых клетках насекомых, амфибий и млекопитающих (И. Барский и др., 1962; Черноградская и Шудель, 1962б; Е. Брумберг, Барский и др., 1963а; Черноградская, Брумберг и др., 1964; Черноградская, Пильщик и др., 1964а), так и на выделенных из клетки органоидах (Баренбойм и др., 1963; Конев, Лыскова и Бобрович, 1963; Конев и Лыскова, 1965). Некоторые тонкие детали локализации свечения в клетке рассмотрены в обзоре Черноградской, Пильщик и др. (1964б).

Вещества, ответственные за флуоресценцию клеток

Вопрос о веществах, ответственных за флуоресценцию клетки, оживленно дискутировался в течение нескольких лет, что неудивительно, если принять во внимание сложнейший химический состав живой клетки.

Флуоресценция приписывалась белкам (Е. Брумберг, Мейсель и др., 1958; Е. Брумберг, Барский и др., 1963б), нуклеиновым кислотам (Е. Брумберг и Барский, 1960, 1961), свободным нуклеотидам (Е. Брумберг, Барский и др., 1960; Е. Брумберг, Барский и Шудель, 1960; Е. Брумберг, Барский и Кондратьева, 1961) и нуклеотидам в комплексе со структурами клеток, обеспечивающим жесткую фиксацию и в связи с этим заметную флуоресценцию хромофора (Е. Брумберг, Барский и др., 1961), коферментам нуклеотидного типа (Черноградская и Шудель, 1962а), убихинонам (Барский и др., 1962; Е. Брумберг, Барский и др., 1963а). Во многих из названных работ вещества, ответственные за флуоресценцию, определялись по изменению свечения при экстракции отдельных веществ из клетки. Не говоря уже о том, что природа свечения живых клеток в этом случае изучается по свечению

мертвых, условия проведения такой экстракции могли резко влиять на квантовый выход флуоресценции за счет изменения рН среды, температуры, конформации биополимеров, взаимодействия хромофора с органическими и неорганическими тушителями и т. д. Однако возможность влияния этих факторов, воздействие которых на флуоресценцию подробно разобрано в предыдущих параграфах, не учитывалась при анализе результатов. Поэтому наиболее достоверные данные о веществах, ответственных за флуоресценцию клеток, были получены спектральными методами: Агроскин и Барский (1961) показали, что спектры возбуждения и флуоресценции клеток совпадают с аналогичными спектрами триптофансодержащих белков. Такое же совпадение спектров флуоресценции было получено в работе Баренбойма и др. (1961). Конев, Лыскова и Бобрович (1963), Конев и Бобрович (1965) показали, что поляризационные спектры флуоресценции фракции изолированных митохондрий и ядер клеток печени белой крысы сходны как по форме, так и по абсолютным величинам поляризации с поляризационными спектрами триптофансодержащих белков. В настоящее время представления о том, что основная часть флуоресценции клеток обусловлена белками, являются общепринятыми (Е. Брумберг и др., 1964). Отсутствие нуклеиновой компоненты в спектре УФ свечения клеток находится в полном согласии с тем фактом, что нуклеиновые кислоты вообще не флуоресцируют при нейтральных значениях рН и возбуждении в области нормального поглощения (см. раздел 2.1).

Так как среди клеточных структур наиболее яркой флуоресценцией обладают митохондрии, то можно было допустить, что свечение клеток обусловлено флуоресценцией белков, входящих в состав митохондрий. В ряде работ (Шудель и др., 1964; Шудель, 1964б, 1965; Е. Брумберг и И. Брумберг, 1964) была изучена связь между ультрафиолетовой флуоресценцией клетки и ее энергетическим обменом. Использование различных метаболических ядов, прерывающих перенос электрона по дыхательной цепи и смещающих окислительно-восстановительный уровень дыхательных ферментов в сторону окисления или восстановления, привело к представлению о том, что свечение клеток обусловлено в основном флуоресценцией белков дыхательных ферментов митохондрий. Грубая оценка, данная в работе Е. Брумберга, Черноградской и Шудель (1964), показывает, что 70—80% излучения ультрафиолетовой флуоресценции клеток асцитного рака Эрлиха обусловлено триптофаном белков дыхательных ферментов митохондрий. Однако Конев и Бобрович (1965), исследуя поляризационные спектры флуоресценции митохондрий, заключили, что вся без исключения УФ флуоресценция их обусловлена триптофановыми остатками. В спектральной области возбуждения 250—296 мкм спектры не зависели от длины волны возбуждающего света, что указывало на участие в свечении клетки только одного центра

свечения, а по форме полученные спектры совпадали с аналогичными спектрами триптофановых остатков в белках.*

Все исследованные белки, содержащие ароматические аминокислоты, флуоресцируют (см. раздел 1.2). Почему же в клетке проявляется свечение в основном митохондриальных белков? По мнению Е. Брумберга, Черноградской и Шудель (1964), это вызвано тем, что в клетке не светят белки, входящие в состав нуклеопротеидов, слабо флуоресцирует ряд ферментов, связанных с тушащими субстратами или коэнзимами. С другой стороны, соединение белков с липидами способствует, по мнению этих авторов, увеличению квантового выхода флуоресценции. Экспериментально это было показано на примерах яркой флуоресценции миелиновой оболочки первого волокна и тех участков складчатой мембраны внешней поверхности эпителия тонкого кишечника, где липопротеиновые мембраны упакованы наиболее плотно.

Известно, что в митохондриях большую группу липопротеинов составляют комплексы липидов с белковыми компонентами цепи переноса электрона. Именно белки, входящие в состав этих комплексов, по мнению авторов цитируемой работы, ответственны за УФ флуоресценцию клеток. Если эти представления верны, то тогда можно считать, что в свечение клетки должны вносить вклад и другие липопротеиновые комплексы, входящие в состав самых различных клеточных структур. Однако эти представления не исключают того, что в ряде случаев в клетке может наблюдаться УФ флуоресценция белков, не входящих в состав липопротеиновых комплексов. Так, например, яркая флуоресценция мышц определяется белками актомиозинового комплекса (Штранкфельд, 1963, 1964а, 1964б, 1964в, 1964г). Неизвестно, связана ли со свечением липопротеинов флуоресценция бактериофагов и бактерий, хотя у последних имеются липопротеиновые комплексы, входящие в состав митохондриоподобных структур (Бирюзова и Мейсель, 1964).

Нерешенным, однако, остается вопрос о физико-химической природе яркой флуоресценции липопротеиновых комплексов. Можно допустить, что в таких комплексах белковая молекула оказывается в условиях повышенной жесткости, так как белок и липид «интимно проникают друг в друга» (Green, 1964). В свою очередь, повышение жесткости молекулы должно привести к увеличению выхода флуоресценции. Можно допустить также, что электростатические и гидрофобные связи, соединяющие белки с липидами, способствуют увеличению выхода флуоресценции. Известно, например, что в фосфолипидах наблюдаются ориентированные полярные группы (Green a. Fleischer, 1962), так что

* Авторы заключали митохондрии в пленку поливинилового спирта. Поэтому исследуемые объекты были не нативны, а может быть просто мертвы: данных о контроле за биологической активностью митохондрий авторы не приводят.

при взаимодействии белка с фосфолипидами полярность окружения белка может меняться, приводя к изменению флуоресценции (см. раздел 1.3). Взаимодействие белка с липидами может также привести к перераспределению зарядов в молекуле белка (Green a. Fleischer, 1962), что может повлиять на флуоресценцию белков (см. раздел 1.3).

О природе изменения интенсивности ультрафиолетовой флуоресценции клетки

Если практически вся УФ флуоресценция клеток обусловлена белками, то изменение свечения клеток в ходе процессов жизнедеятельности или под воздействием различных факторов может быть связано с изменением концентрации белков, с изменением экранировки белков веществами, поглощающими УФ, но не флуоресцирующими, и с изменением конформации белковых макромолекул (Баренбойм и др., 1961).

Вспышка флуоресценции лейкоцитов крови при фагоцитозе, например, предположительно может быть связана с усиленным синтезом протеолитических ферментов (И. Брумберг и Е. Брумберг, 1964а), т. е. с увеличением концентрации белка. Изменение флуоресценции клеток под действием рентгеновского или УФ излучения может быть, в частности, сопоставлено с изменением экранировки белков при лучевой деградации ДНК: такое предположение обсуждается в работе Баренбойма и др. (1961, 1963).

Однако основной причиной изменения свечения клетки является, на наш взгляд, изменение конформации белков клетки. Эта точка зрения подкрепляется следующими соображениями.

1. Флуоресценция клеток обусловлена свечением белков.
2. Универсальной реакцией клетки на внешнее воздействие является обратимая белковая реакция (Насонов и Александров, 1940; Насонов, 1959) или конформационные изменения белков, говоря языком современной молекулярной биохимии.

3. Конформационные изменения, даже сравнительно небольшие, отражаются на квантовом выходе флуоресценции белков, как это было показано ранее (см. разделы 1.2, 1.3 и 1.4).

Теперь обратимся вновь к тем конкретным случаям, когда за УФ флуоресценцию клеток отвечают митохондриальные белки, находящиеся в комплексе с липидами.

Известно, что самые различные факторы вызывают однотипную реакцию митохондрий, выражающуюся в их набухании или уменьшении объема, сопровождаемых структурными изменениями митохондриальных мембран (см. обзор: Машанский, 1965).

Тот факт, что изменения УФ флуоресценции митохондрий связаны с изменением их структуры, был отмечен Шудель (1965) прямыми микроскопическими наблюдениями, в том числе и электронномикроскопическими, а затем Коневым и Лысковой (1965),

в опытах которых изменение дыхания фракции изолированных митохондрий при добавлении янтарной кислоты приводило к изменению как УФ флуоресценции, так и светорассеяния, связанного с размерами митохондрий. Как известно, янтарная кислота вызывает набухание митохондрий (Hanter, 1962). Кроме белков, связанных с дыхательными коферментами, в митохондриях имеются другие белки, которые могли бы флуоресцировать, например, структурные белки, гидрофобно реагирующие с мицеллами фосфолипидов с образованием белково-липидной сетки, и актомиозиноподобный белок (АМ-белок). Апоферментный и структурный белки, а также АМ-белок претерпевают, как предполагается, конформационные изменения при сокращении митохондриальных мембран и набухании митохондрий (Leninger, 1962a, 1964; Green, 1964; Нейфах, 1964).

Пока нет более точных экспериментальных данных, мы вправе предполагать, что связанные с набуханием митохондрий конформационные изменения трех названных выше типов белков и определяют изменения флуоресценции митохондрий при различных воздействиях.* Вклад каждого из этих типов белков в свечение митохондрий пока не определен. Не исключено, что значительную роль в свечении могут играть АМ-белки, так как актомиозиновый комплекс обладает интенсивной флуоресценцией (Бурштейн и Суслова, 1964; Штрапфельд, 1964a, 1964b, 1964в), возможно, из-за высокого содержания триптофана (аминокислотный состав АМ-белков см., например, в кн.: Поглазов, 1965). В связи с этим отметим, что, по данным Колева и Бобровица (1965), поляризационные спектры флуоресценции митохондрий соответствуют спектрам белков, богатых триптофаном.

В работе Шудель (1965), где анализируется действие разобщающих дыхание ядов на флуоресценцию, в качестве возможной причины изменения флуоресценции клеток обсуждаются конформационные изменения дыхательных ферментов. Однако при дыхании и при воздействии почти всех разобщающих ядов происходят механо-химические изменения мембран митохондрий (Leninger, 1962a; Hanter, 1962), поэтому влияние на флуоресценцию митохондрий различных ядов, ингибирующих клеточное дыхание, не обязательно следует связывать только с влиянием этих ядов на ферментативные белки цепи транспорта электронов.

* Колев и Лыскова (1965) наблюдали, что добавление мочевины к суспензиям митохондрий, различающихся по интенсивности дыхания, уменьшало различие в интенсивности свечения этих суспензий. Авторы рассматривают это как прямое доказательство того, что на интенсивность свечения влияют третичная и четвертичная структуры белка, нарушаемые мочевиной. Однако не исключено, что в данном случае проявляется не прямое воздействие мочевины на белки, обуславливающие свечение, а опосредованное, так как в использованных концентрациях мочевина может вызывать набухание митохондрий.

Применение ультрафиолетовой флуоресцентной микроскопии для исследования клеток и тканей

Можно сказать, что экспериментаторам повезло в том, что свечение клеток в большинстве случаев обусловлено митохондриями, которые являются одним из самых лабильных органоидов клетки и весьма чувствительны к различным изменениям состояния клеток. По изменению различных характеристик митохондрий можно судить о различиях в физиологическом состоянии клеток, определять ранние стадии клеточной альтерации и т. д. Самые различные факторы — гормональные препараты, ионы тяжелых металлов, голодание, наркотики, яды, воздействие сублетальной температуры — вызывают однотипную реакцию митохондрий, выражающуюся в их набухании или уменьшении объема (см. обзор: Машанский, 1965).

Соответственно и УФ флуоресценция клеток меняется при механических повреждениях (Е. Брумберг, Барский и др., 1961); изменении концентрации кислорода (по нашим данным); повышении (И. Брумберг и Дунаева, 1964) или понижении (И. Брумберг, 1964) температуры; при воздействии альтерирующих веществ: уретана, хлоралгидрата, метилового спирта (И. Брумберг, и Дунаева, 1964), метаболитических ядов (Е. Брумберг и И. Брумберг, 1964; Шудель и др., 1964); при действии рентгеновского (Баренбойм и др., 1961) и ультрафиолетового облучения (Е. Брумберг и Барский, 1961; Е. Брумберг, Барский и Кондратьева, 1961; Помощникова и Агроскин, 1961).

Особенно большое число работ посвящено исследованию изменения УФ флуоресценции клеток как чувствительного критерия лучевого поражения (Е. Брумберг, Барский и Шудель, 1960; Хан-Магомедова и др., 1960; Баренбойм и др., 1961, 1963; Барский и др., 1961; Е. Брумберг и Барский, 1961; Е. Брумберг, Барский и Кондратьева, 1961; Мейсель и др., 1961; Помощникова и Агроскин, 1961; Баренбойм, 1963; Мейсель и Мантейфель, 1963; Кондратьева и др., 1964).

Лучевое поражение клетки начинается с атомно-молекулярного уровня. Квантовый выход (или интенсивность) флуоресценции также является молекулярной характеристикой. Поэтому следует ожидать, что изменения УФ флуоресценции клеток могут отражать ранние стадии лучевого поражения.

Действительно, в работе Баренбойма и др. (1961) изменение ультрафиолетовой флуоресценции лейкоцитов облученной крови обнаруживались при дозе облучения, составляющей всего 42 рада (рис. 1. 20). Зависимость флуоресценции клеток от состояния митохондрий также способствует раннему обнаружению лучевого поражения, так как уже на ранних его этапах наступают структурные и биохимические изменения митохондрий (Vasq a. Alexander, 1961; Мантейфель и Мейсель, 1962). Баренбойм и др. (1963)

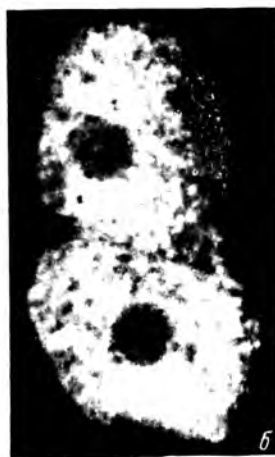
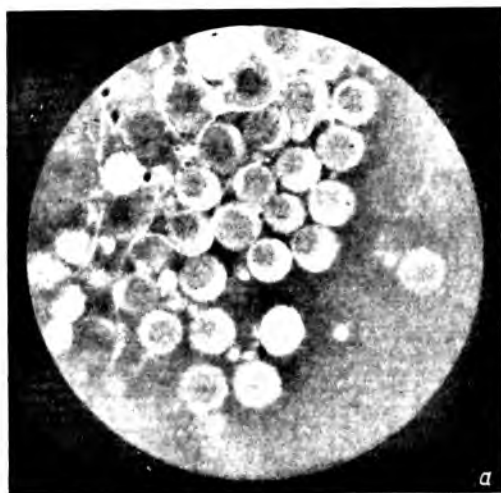
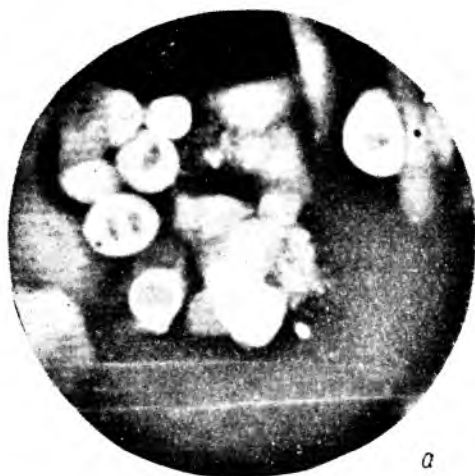
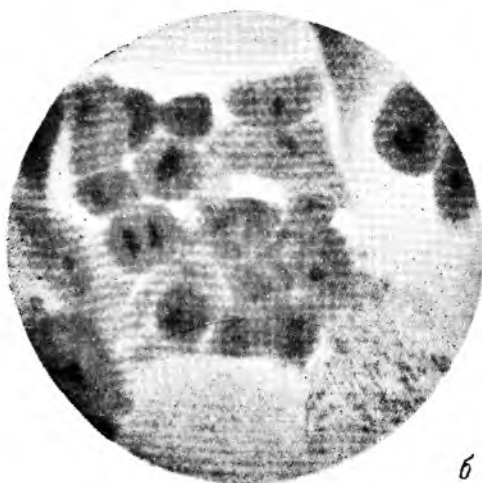


Рис. 1.19. Флуоресценция митохондрий в различных клетках.

а — сперматиды кузгечика; ярко флуоресцируют скопления митохондрий, так называемые «околоядерные тельца», Nebenkern). б — печеночные клетки аксолотля; ярко флуоресцирующие гранулы — митохондрии. в — эпителиальные клетки тонкого кишечника аксолотля; наиболее ярко флуоресцируют ядерные участки цитоплазмы, где преимущественно располагаются митохондрии; яркой флуоресценцией обладают также щеточные кромки клеток.



a



b

Рис. 1.21. Делящиеся клетки культуры ткани.

a — в свете ультрафиолетовой флуоресценции (320—400 мμ), *б* — в проходящих лучах (250—280 мμ).

обнаружили изменение свечения фракции изолированных митохондрий раньше, чем в них можно было обнаружить биохимические изменения.

Изменения УФ флуоресценции клеток обнаружены при самых различных процессах, происходящих в клетках и организмах, таких как митоз (Е. Брумберг, Мейсель и др., 1961; Черногрядская, Бузе и Асташина, 1964; см. также рис. 1.21), изменения уровня дифференцировки (Бреслер, Кудрявцева и др., 1964; Бреслер и Воробьев, 1965), эмбриогенез и постнатальное развитие (Пильщик и Николаева, 1963; Пильщик и Кудрявцева, 1965), регенерация (Шудель, 1964а, 1965; Черногрядская, Бреслер и др., 1965), прохождение возбуждения по нервному волокну (Ungar a. Romano, 1962), «переживание» мышц *in vitro* (Барский и др., 1962; Штранкфельд, 1963, 1964а, 1964б, 1964в, 1964г), первичное действие канцерогена на клетку (Бреслер, Кудрявцева и др., 1964; Бреслер, Брумберг и др., 1965; Бреслер, Черногрядская и др., 1965) и т. д.

Интенсивность УФ флуоресценции меняется у опухолевых и лейкозных клеток (Е. Брумберг и Барский, 1961; Барский и И. Брумберг, 1962; Мейсель и др., 1962; Розанова и др., 1962, 1963; И. Брумберг и Е. Брумберг, 1964б; Шудель, 1964б; Бреслер, 1965).

Анализ люминесцентных данных в большинстве названных работ носит в основном качественный характер; изменение флуоресценции показывает, что произошли какие-то сдвиги в клетке. Такой качественный характер анализа результатов сложился исторически: развитие УФ флуоресцентной микроскопии опередило работы по определению структурных и биохимических носителей флуоресценции в клетке.

В ряде последних работ (см., например: Бреслер, Кудрявцева и др., 1964; Шудель, 1965) изучение УФ флуоресценции используется как один из методов цитологического исследования параллельно с цитоспектрофотометрией, измерением ферментативной активности, изучением ультраструктуры митохондрий, светорас-

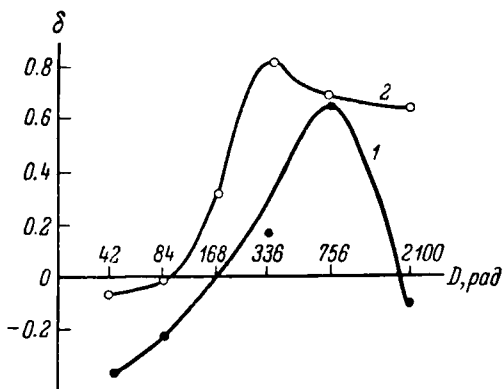


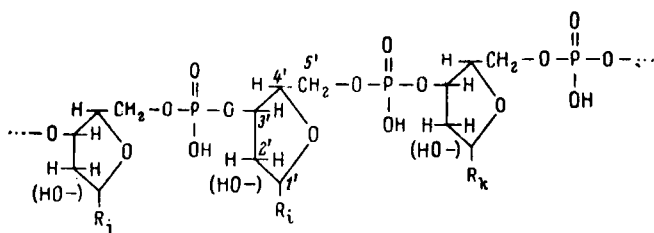
Рис. 1.20. Влияние радиации на флуоресценцию лейкоцитов (Баренбойм и др. 1962).

По оси абсцисс — дозы облучения (рад, логарифмическая шкала); по оси ординат — относительный эффект через 1 час после облучения.
1 — лимфоциты, 2 — сегментоядерные нейтрофилы.

сеянием и т. д. Такое сочетание методов позволяет получать количественные результаты и максимально использовать достоинства метода УФ флуоресцентной микроскопии. Кроме того, в настоящее время намечается связь между многочисленными данными о зависимости люминесценции от конформации белковых макромолекул, с одной стороны, и данными по УФ люминесценции клеток, с другой. Следует надеяться, что после точной идентификации белковых молекул, ответственных за флуоресценцию клетки, можно будет обратиться к данным, связывающим УФ флуоресценцию с состоянием белковой молекулы. Тогда люминесцентный анализ позволит получать сведения о конформационных превращениях белковых молекул в живой клетке.

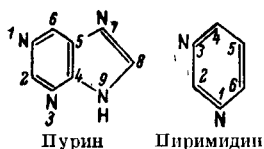
ЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ ПУРИНОВ, ПИРИМИДИНОВ И НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Нуклеиновые кислоты — высокомолекулярные соединения, цепь главных валентностей которых состоит из чередующихся углеводных остатков и фосфатных групп:



Существует два типа нуклеиновых кислот: дезоксирибонуклеиновая (ДНК) и рибонуклеиновая (РНК). В ДНК углеводным остатком является дезоксирибоза, в РНК — рибоза, которая отличается от дезоксирибозы тем, что водород углеводного остатка в положении 2' замещен ОН-группой. Во всем остальном цепи главных валентностей нуклеиновых кислот идентичны.

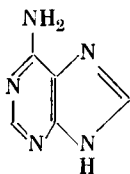
Боковые радикалы R , последовательность которых определяет первичную структуру нуклеиновой кислоты, являются простыми производными пурина и пириимидина:



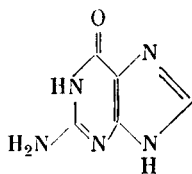
Их связь с углеводными остатками осуществляется атомами N_9 и N_1 для пуринов и пириимидинов соответственно.

В состав ДНК входят два пуриновых основания — аденин и гуанин и два пириимидиновых — цитозин и тимин. В составе РНК содержатся аденин, гуанин и цитозин, а вместо тимина — урацил.

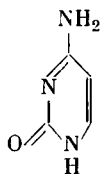
Ниже приводятся формулы этих оснований в кето- и амино-формах: *



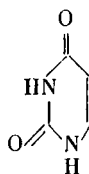
Аденин



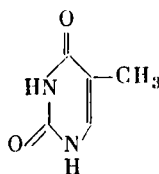
Гуанин



Цитозин



Тимин



Урацил

Значительно реже в составе нуклеиновых кислот встречаются и другие производные пурина и пиримидина.

Соединения, состоящие из пуринового или пиримидинового основания и углеводного остатка, называются нуклеозидами. Присоединение фосфатной группы к углеводным остаткам нуклеозидов приводит к образованию нуклеотидов.

Пуриновые и пиримидиновые основания входят не только в состав нуклеиновых кислот, но и в состав целого ряда других низкомолекулярных биологически важных соединений. Особую роль играют биологически важные соединения аденина. В качестве примера можно назвать молекулу аденозинтрифосфата (АТФ), являющуюся своеобразным аккумулятором энергии в живых системах.

Пативная ДНК представляет биспираль,** образованную двумя полинуклеотидными цепями, которую можно уподобить винтовой лестнице: ступенями ее служат азотистые основания, а перилами — чередующиеся эфирносвязанные остатки фосфорной кислоты и дезоксирибозы. Две полинуклеотидные цепи ДНК комплементарны друг другу в том смысле, что аденину одной цепи соответствует тимин, а гуанину — цитозин во второй. Таким образом, последовательность чередования оснований в одной из цепей

* Азотистые основания могут претерпевать кетоэволюционные и аминиминные таутомерные превращения:



Равновесное содержание тех или иных таутомерных форм зависит от температуры и pH среды. При обычных условиях (комнатные температуры, нейтральные значения pH) основания находятся преимущественно в кето- и аминоформах. Более подробно вопрос о таутомерных превращениях пуринов и пиримидинов рассматривается, например, в книге Пульмана и Пульман (Pullman a. Pullman, 1963).

** Существует по крайней мере одно исключение из этого правила — односпиральная ДНК фага φх174.

(ее первичная структура) однозначно определяет первичную структуру второй цепи.

Полинуклеотидные цепи ДНК соединены водородными связями между азотистыми основаниями. Образование пар А—Т и Г—Ц соответствует максимальному числу межмолекулярных водородных связей между цепями и, кроме того, при этом выполняется стерическое условие, необходимое для возникновения регулярной структуры — равенство по длине «ступенек» ДНК.

Вопрос о природе сил, стабилизирующих спираль ДНК, окончательно не решен. По-видимому, структуру ДНК определяют не только водородные связи, но также ван-дер-ваальсовы и гидрофобные силы взаимодействиями между азотистыми основаниями.

Несмотря на жесткую спиральную структуру, молекула ДНК в растворе не является идеально жесткой палочкой — она может изгибаться в местах нарушения спиральной структуры и за счет этого приобретает в растворе конфигурацию очень рыхлого клубка.

Хотя химическое строение ДНК и РНК весьма сходно, их макромолекулярные структуры существенно различаются. Макромолекула РНК в отличие от ДНК состоит из одной полинуклеотидной цепи. Ее вторичная структура — это чередующиеся биспиральные и одноцепочечные участки. Спиральные участки стабилизируются внутримолекулярными водородными связями между пуриновыми и пиримидиновыми основаниями (пары А—У и Г—Ц). Структура РНК в растворе весьма чувствительна к изменениям условий внешней среды и ее не следует рассматривать как фиксированную нативную структуру: при низкой ионной силе и комнатной температуре биспиральные участки ориентируются перпендикулярно длинной оси макромолекулы и накладываются друг на друга в виде стопки, что приводит к палочкообразной конформации. При повышении ионной силы молекулы РНК становятся менее асимметричными и напоминают компактные клубки. При очень низкой ионной силе или при повышенной температуре наблюдается распрямление спиральных участков и молекула переходит в рыхлый беспорядочный клубок. Подробные сведения о макромолекулярной структуре и функциональном значении нуклеиновых кислот можно найти в монографиях Бреслера (1963) и Волькенштейна (1965), в обзоре Тихоненко (1965), посвященном ДНК, и книге Спирина (1963), посвященной РНК.

2.1. ЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ ПУРИНОВ И ПИРИМИДИНОВ

Изучение люминесцентных свойств пуриновых и пиримидиновых производных уже давно привлекало внимание исследователей. В качестве примера можно указать на работу Стимсона и Рентера, выполненную еще в 1941 г. (Stimson and Renter, 1941).

Свечение, обнаруженное этими авторами в видимой области и, по-видимому, обусловленное примесями, присутствующими в препаратах наблюдалось визуально.

Изучение люминесцентных свойств пуриновых и пиримидиновых оснований важно не только для понимания люминесцентных свойств нуклеиновых кислот, но представляет и самостоятельный интерес из-за важной роли соединений, в которые входят пуриновые и пиримидиновые производные, в самых различных процессах жизнедеятельности, от дыхания до мышечного сокращения.

Первые исследования собственной люминесценции оснований нуклеиновых кислот с применением спектральных приборов и фотоэлектронных умножителей начались всего 10 лет назад.

В работе Шора и Парди (Shore a. Pardee, 1956) были исследованы нуклеозиды и нуклеотиды оснований нуклеиновых кислот в нейтральных водных растворах, а также тимидин, аденизин-5-фосфат, цитозин, адениловая кислота и аденозин в 0.1 н. HCl и 0.1 н. NaOH. Ни в одном случае не было обнаружено флуоресценции этих соединений в видимой и УФ области спектра, что, по-видимому, было связано с низкой чувствительностью установки. Не обнаружил флуоресценции растворов аденина и адениловой кислоты также Вебер (Weber, 1957), хотя использованная им установка была более чувствительной.

Впервые УФ флуоресценция ряда пуриновых производных (аденин, гуанин, их нуклеозиды и нуклеотиды) была зарегистрирована в работе Дуггана и др. (Duggan et al., 1957). Анализ последующих работ показывает, что люминесценция пуринов и пиримидинов возникает при возбуждении в трех различных областях спектра: 1) в области длин волн менее 300 мкм, 2) в области около 300 мкм, 3) в области 350—360 мкм. В зависимости от области возбуждения изменяются свойства наблюдаемого свечения. При этом нужно заметить, что люминесценция при возбуждении в той или иной спектральной области наблюдалась лишь в определенных условиях. Это может быть обусловлено как спецификой свечения при возбуждении в различных спектральных областях, так и неполнотой экспериментального материала.

Рассмотрим последовательно характеристики люминесценции пуринов и пиримидинов при возбуждении в различных областях спектра.

*Люминесценция пуринов и пиримидинов
при возбуждении в области длин волн
менее 300 мкм*

Хромофорами, определяющими оптические свойства рассматриваемого класса соединений, являются пуриновые и пиримидиновые кольца. Пурин, пиримидин и их производные поглощают в УФ области спектра. Коэффициент поглощения в несколько раз превышает соответствующую величину для наиболее сильно по-

глощающей аминокислоты — триптофана. Спектрам поглощения азотистых оснований и нуклеиновых кислот посвящена большая литература. Подробные сведения о спектрах поглощения рассматриваемого класса веществ можно найти в обзорах Бивена и др. (Beaven et al., 1955), Макларена и Шугара (McLaren a. Shugar, 1964).

Спектры поглощения большого числа нуклеозидов и нуклеотидов приведены в атласе Венкстерна и Баева (1965). Для общего представления на рис. 2.1 приведены спектры поглощения оснований нуклеиновых кислот.

Ввиду того что биологически важные производные пурина и пиримидина образуются за счет присоединения заместителей непосредственно к кольцу, их поглощение и особенно люминесценция в значительной мере определяются природой этих заместителей.

Способность этих соединений к протолитическим реакциям, таутомерным превращениям, различным взаимодействиям с образованием водородных связей, комплексов с переносом заряда и т. д. определяет сильную зависимость флуоресцентных свойств от условий, в которых они изучаются.

Флуоресценция водных растворов пуринов и пиримидинов при комнатной температуре. Изучению этого вопроса посвящено наибольшее число работ. Результаты исследования флуоресцентных свойств ряда пуриновых и пиримидиновых производных в этих условиях, полученные Борезеном (Börresen, 1963a) и частично другими авторами, представлены в табл. 2.1. Абсолютные значения квантовых выходов флуоресценции большого числа пуринов и пиримидинов были определены в работе Борезена. В многих случаях эти результаты можно сравнить с результатами других авторов

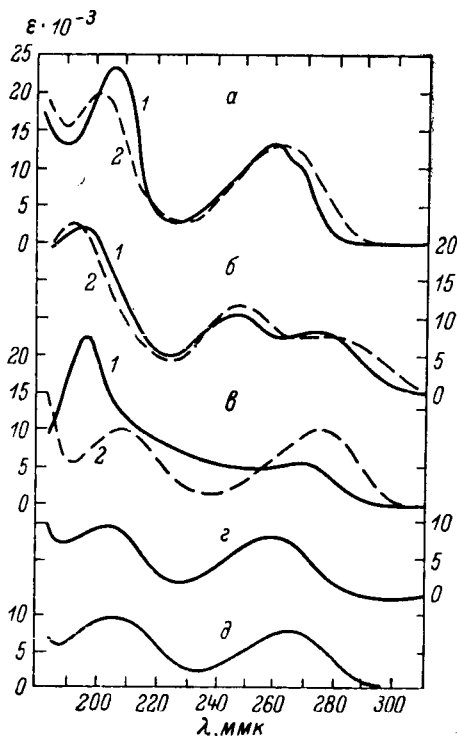


Рис. 2.1. Спектры поглощения оснований нуклеиновых кислот (Vost et al., 1963).

ϵ — молярный коэффициент поглощения. а — аденин: 1 — при pH 7.0, 2 — при pH 2.5; б — гуанин: 1 — при pH 6.2, 2 — при pH 1.6; в — цитозин: 1 — при pH 8.8, 2 — при pH 2.5; г — урацил, при pH 7.0.

Таблица 2.1

ХАРАКТЕРИСТИКИ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ПУРИНОВЫХ И ПИРИМИДИНОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ ПРИ КОМНАТНОЙ ТЕМПЕРАТУРЕ

Вещество	рК		Квантовый выход флуоресценции	Длина волны максимума спектра флуоресценции (ммк)
	по данным флуорометрического титрования	по данным других методов		
Аденин	4.2	4.15; 9.8	0.003 0.002 (рН 1) * 0.0015 (рН 1) **	380
Адепозин	3.7	3.63	0.003 0.005 (рН 1) **	390
Аденозинмонофосфат (АМФ)	3.95	3.74	0.004	400
Аденозиндифосфат (АДФ)	4.3	3.95	0.006	390
Аденозинтрифосфат (АТФ)	4.6	4.0	0.011	400
2-амино-4-метил-пиридин	{ 4.0 12.5	{ 4.15 —	{ 0.062	350
2,6-диаминопурин	{ 5.05 10.7	{ 5.09 10.77	{ 0.022 (рН 8) {	340 (рН 2) 350 (рН 9)
Гуанин	{ 3.4 9.3 12.7	{ 3.3 9.2 12.3	0.005 (рН 2) 0.024 (рН 10.7) 0.03 (рН 11) *	355 (рН 2) 340 (рН 11) —
Гуанозин	2.2	2.2	0.007	390
Гуанозинмонофосфат (ГМФ)	{ 2.5 9.4 12.7	{ 2.4 9.4 —	0.008 (рН 1) 0.008 (рН 10.6)	380 (рН 1) 340 (рН 10.8)
Гуанозиндифосфат (ГДФ)	{ 3.1 —	{ 2.9 9.6	{ 0.018	385
Гуанозинтрифосфат (ГТФ)	{ 3.4 —	{ 3.3 9.3	{ 0.010	380
Пурин	{ 3.2 9.2	{ 2.39 8.93	0.008 (рН 2.46) 0.0018 (рН 8) 0.045 (рН 10.6)	400 (рН 2) 380 (рН 5.2) 370 (рН 11)
Пиримидин	2.0	1.3	0.007	360
Тимин			0.015 (рН 11) *	380 (рН 11) *

Примечание. Таблица составлена на основании аналогичной таблицы в работе Борезена (Börresen, 1963a) с некоторыми сокращениями. Дополнительно в таблицу внесены некоторые данные из работ Юденфренда и Зальтцман (Udenfriend a. Zaltzman, 1962) и Валаас (Walaas, 1963). Данные первой из названных работ отмечены одной звездочкой, данные Валаас — двумя звездочками.

За исключением случаев, когда значения рН указаны в скобках, данные соответствуют рН, при которых интенсивность флуоресценции максимальна. Для некоторых из этих соединений соответствующие значения рН можно определить по рис. 2.2.

Udenfriend, 1962; Udenfriend a. Zaltzman, 1962; Walaas, 1963). Такое сравнение показывает различия величин квантовых выходов, определенных разными авторами. Приведенные в табл. 2.1 значения длин волны максимума спектров флуоресценции, также несколько отличаются от соответствующих значений, полученных в работах Юденфренда (Udenfriend, 1962; Udenfriend a. Zaltzman, 1962) и Валааса (Walaas, 1963). Эти различия могут быть связаны с трудностями регистрации слабых свечений рассматриваемых соединений, с их недостаточной чистотой, а также с отсутствием или недостаточной точностью поправок на спектральную чувствительность регистрирующей части аппаратуры.

Однако рассмотрение данных, представленных в табл. 2.1, позволяет сделать некоторые выводы о флуоресцентных свойствах производных пурина и пиримидина. Рассмотрим более подробно флуоресцентные свойства биологически важных производных пурина и пиримидина.

Аденин и его производные имеют заметную флуоресценцию лишь в кислых средах и не флуоресцируют в нейтральной и щелочной среде. По данным Юденфренда и Зальтцман (Udenfriend a. Zaltzman, 1962), максимум спектра флуоресценции аденина в водном растворе при pH 1 наблюдается при 380 мкм и квантовый выход его составляет 0.002. Переход от кислой среды к нейтральной сопровождается постепенным уменьшением квантового выхода флуоресценции (рис. 2.2). Борезен (Börresen, 1963a) установил, что для аденина значение pK , полученное флуоресцентным методом ($pK_{фл}$ — см. стр. 30), при переходе от кислой среды к нейтральной хорошо соответствует значению pK , полученному другими методами, и пришел к заключению, что зависимость интенсивности флуоресценции аденина от pH определяется протолитической реакцией. До настоящего времени остается дискуссионным вопрос о том, к какой группе аденина присоединяется протон

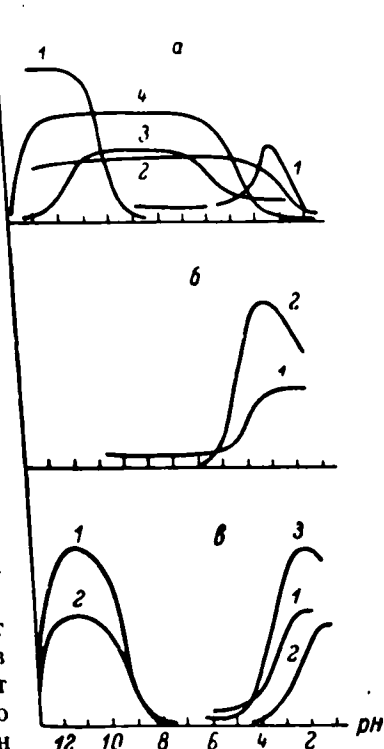


Рис. 2.2. Зависимость относительной интенсивности флуоресценции (I) растворов ряда пуринов и пиримидинов от pH (Börresen, 1963a).

а: 1 — пурин, 2 — пиримидин, 3 — 2,6-диаминопурин, 4 — 2-амино-4-метилпиримидин. б: 1 — аденин, 2 — адениндинитрифосфат. в: 1 — гуанин, 2 — гуанозинмонофосфат, 3 — гуанозиндинитрифосфат.

в кислой среде. Расчеты, произведенные Пульманом и Пульман (Pullman a. Pullman, 1963), результаты рентгеноструктурного анализа катиона аденина (Cockran, 1951; Broothhead et al., 1962), изучение влияния протонизации аденина на его инфракрасные спектры (Tsuboi et al., 1962) и ряд других данных говорят в пользу того, что протон присоединяется к азоту в положении 1. К такому же выводу пришел Борезен (Börresen, 1963a), основываясь на своей гипотезе о механизме влияния протеолитических реакций на флуоресценцию пуриновых и пиримидиновых оснований.

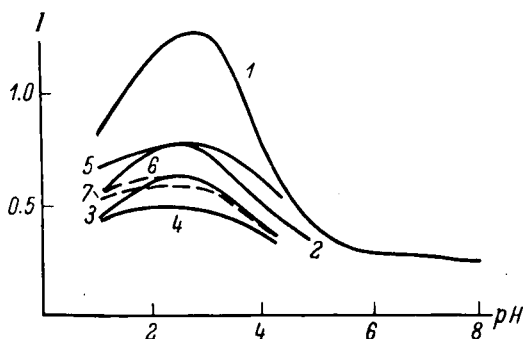


Рис. 2.3. Зависимость относительной интенсивности флуоресценции (I) аденина и его производных от pH (Watanabe et al., 1963).

1 — аденозинтрифосфат, 2 — аденозиндифосфат, 3 — аденозинмонофосфат, 4 — аденозин, 5 — аденин в 1.0 М $(\text{CH}_3)_4\text{NCl}$, 6, 7 — АТФ и АДФ в 1.0 М $(\text{CH}_3)_4\text{NCl}$ и 0.5 М MgCl_2 .

Согласно другому представлению, в кислой среде происходит протонизация аминогруппы аденина ($\text{NH}_2 \rightleftharpoons \rightleftharpoons \text{NH}_3^+$). Так, Валаас (Walaas, 1963) в доказательство этого предположения приводит данные о том, что выход флуоресценции растворов инозинмонофосфата, отличающегося от АМФ заменой группы NH_2 группой OH у углерода C_6 пуринового кольца, сохраняется постоянным в области pH от 1 до 10. Однако это

доказательство нельзя считать убедительным: замена группы NH_2 группой OH может существенно изменить всю электронную структуру молекулы и тем самым ее флуоресцентные свойства.

Для выяснения того, как могут измениться флуоресцентные свойства аденина при его включении в молекулу ДНК, большой интерес представляло изучение свойств простых производных аденина — его нуклеозидов и нуклеотидов. Наиболее всестороннее сравнение флуоресцентных свойств аденина и его производных было выполнено в работе Ватанейба и др. (Watanabe et al., 1963).

Авторы этой работы на основе анализа зависимости интенсивности флуоресценции от pH для аденина, аденозина, АМФ, АДФ и АТФ, а также на основе анализа влияния на эту зависимость ионов металлов (рис. 2.3) сделали интересные выводы о конфигурации нуклеотидов аденина в растворе. По их мнению, отрицательно заряженные фосфатные группы непосредственно взаимодействуют с пуриновым кольцом, чем и обусловлена более интенсивная флуоресценция нуклеотидов по сравнению с аденином и аденозином. Такая кольцевая конфигурация нуклеотидов нару-

нается в присутствии ионов металлов (Ca^{++} и Mg^{++}), которые конкурируют с пуриновым кольцом за связь с фосфатными группами.

В работе Валаас (Walaas, 1963) получены результаты, согласно которым при pH 1 выход флуоресценции аденина и его производных уменьшается в ряду соединений: аденозин—АТФ—АДФ—АМФ—аденин, что противоречит результатам Ватанейба и др. (Watanabe et al., 1963).

Гуанин, его нуклеозиды, нуклеотиды и некоторые из его метилированных производных являются наиболее интенсивно флуоресцирующими соединениями среди пуринов. Гуанин, так же как и аденин, не флуоресцирует в растворе при нейтральных значениях pH. Флуоресценция гуанина возрастает при переходе к кислым и щелочным средам (рис. 2.2). Наибольший квантовый выход у гуанина в щелочной области обнаружен при pH 11. В этих условиях $q=0.03$, а максимум спектра флуоресценции наблюдается при 350 мкм (Udenfriend a. Zaltzman, 1962). В кислой среде квантовый выход гуанина достигает максимального значения ($q=0.005$) при pH 2. При этом максимум спектра флуоресценции наблюдается при 355 мкм (Börresen, 1963a).

Присоединение к гуанину углеводного кольца и фосфатных групп приводит к резкому изменению флуоресцентных свойств. По данным Юденфренда и Зальтцман (Udenfriend a. Zaltzman, 1962), нуклеозиды и нуклеотиды гуанина почти не флуоресцируют в щелочной среде. Это, однако, противоречит данным Борезена (Börresen, 1963a), согласно которым квантовый выход флуоресценции АМФ при pH 10.6 равен 0.008. Таким образом, и в этом случае существует некоторое расхождение между результатами разных авторов.

Интересно, что при метилировании аминогруппы гуанина образуются соединения с очень интенсивной флуоресценцией. Интенсивность свечения раствора диметиламиногуанина, который в больших количествах содержится в транспортной РНК, при pH 11 превышает интенсивность свечения триптофана в растворе при нейтральных значениях pH (Udenfriend a. Zaltzman, 1962).

Из пиримидиновых оснований нуклеиновых кислот только тимин обнаруживает заметную флуоресценцию. Его квантовый

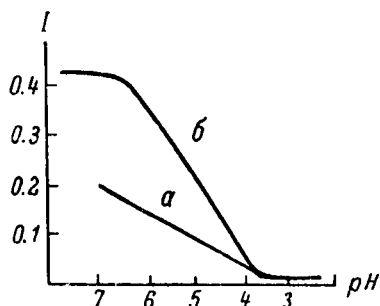


Рис. 2.4. Зависимость интенсивности флуоресценции (а) и фосфоресценции (б) АМФ в замороженном растворе (77° К) от pH (Rahn et al., 1964).

выход в щелочной среде составляет 0.0015. Даже нуклеозидные и нуклеотидные формы тимина не флуоресцируют в растворе (Udenfriend и Zaltzman, 1962).

Флуоресценция растворов пуринов и пиримидинов при низкой температуре. Флуоресцентные свойства пуриновых и пиримидиновых оснований в замороженных растворах сильно отличаются от их флуоресцентных свойств в растворах при комнатной температуре. Лонгворт

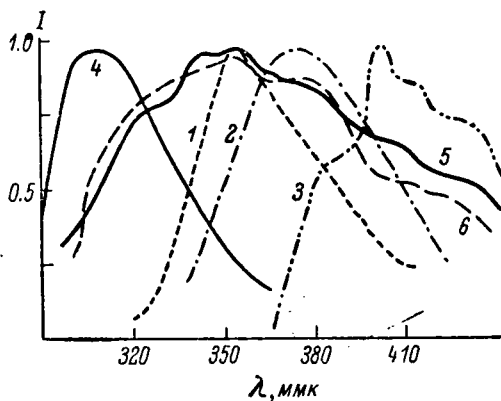


Рис. 2.5. Спектры флуоресценции твердых препаратов ДНК и ее оснований при низкой температуре.

1 — аденин, 2 — гуанин, 3 — цитозин, 4 — тимин, 5 — ДНК из эритроцитов кур; все при 90° К; 6 — низкополимерная ДНК, твердый препарат при 300° К (1—5 — по данным Агроскина и др., 1960). I — интенсивность флуоресценции (отн. ед.).

(Longworth, 1962) сообщил о флуоресценции пурина, аденина и гуанина в полярных замороженных смесях пропан 1,2-диола и воды (1 : 1) при 77° К и pH 7. В этих условиях максимум спектра флуоресценции пурина наблюдается при 297 мкм, аденина — при 229 и 306 мкм и гуанина — при 323 мкм; их квантовые выходы составляют 0.02, 0.06 и 0.09 соответственно. Спектр флуоресценции аденина в этих условиях имеет колебательную структуру.

Особо следует отметить то обстоятельство, что при низкой температуре максимальный выход флуоресценции наблюдается при нейтральных значениях pH

(Rahn et al., 1964; рис. 2.4). Этот результат подтвержден в предварительном сообщении Борезена (Börresen, 1963b), который указывает на то, что флуоресценция АТФ в смеси вода—метанол (1 : 3) при pH 3.5 практически исчезает при понижении температуры. Борезен объясняет такую «странную» температурную зависимость тем, что испусканию флуоресценции этого соединения должен предшествовать процесс перехода молекулы из состояния $\pi\pi^*$ в состояние $\pi\pi^*$, требующий для своего осуществления термической активации. Можно предложить и другие объяснения. В частности, можно представить, что изменение температуры смещает равновесие различных таутомерных форм молекулы. Необходимо также выяснить влияние состава растворителя на флуоресцентные свойства оснований. Изучение температурной зависимости интенсивности флуоресценции оснований при различных pH может дать сведения об энергетических уровнях молекулы.

Флуоресценция пуринов и пиримидинов в твердом агрегатном состоянии. Флуоресценция таких препаратов пуринов и пиримидинов при комнатной температуре никем не изучалась. Флуоресценция этих препаратов при низкой температуре (90°K) и при возбуждении в области $260\text{--}280\text{ мкм}$ изучалась Агроскиным и др. (1960). Наиболее интересен тот факт, что в этих условиях наблюдалось свечение как пуриновых, так и пиримидиновых оснований. Спектры флуоресценции оснований в этих условиях изображены на рис. 2.5.

Так как Агроскиным и др. (1960) исследовались пуриновые и пиримидиновые основания при глубоком охлаждении в твердом агрегатном состоянии, то появление флуоресценции веществ, не флуоресцирующих в растворах, можно связать как с влиянием охлаждения, так и с влиянием агрегатного состояния. Возможность влияния изменения агрегатного состояния на флуоресцентные свойства рассматриваемых соединений вытекает, например, из сообщения Барского (1959) о том, что интенсивность флуоресценции гуанина, адсорбированного на бумаге, значительно выше, чем в растворе. Таким образом, есть основание предполагать, что слабая флуоресценция может быть обнаружена уже в твердых образцах пуринов и пиримидинов и что охлаждение способствует ее усилению.

Фосфоресценция замороженных растворов пуринов и пиримидинов. Впервые фосфоресценцию пурина, аденина и гуанина в замороженных растворах (77°K) при pH 7 наблюдал Лонгворт (Longworth, 1962). Спектр фосфоресценции этих соединений расположен в области $360\text{--}500\text{ мкм}$ с максимумами при 400 , 388 и 410 мкм ; квантовые выходы их составляют 0.038 , 0.045 и 0.036 соответственно. Спектры фосфоресценции аденозина и гуанозина представлены на рис. 2.6. Спектр фосфоресценции аденина и его производных сильно структурирован. Следует обратить внимание на то, что интенсивность фосфоресценции максимальна в нейтральной среде и спадает при переходе к кислым средам (Rahn et al., 1964).

Время затухания фосфоресценции гуанина и его производных — 1.2 сек. , аденина и его производных — 2.3 сек. (Bersohn a. Isenberg, 1963, 1964).

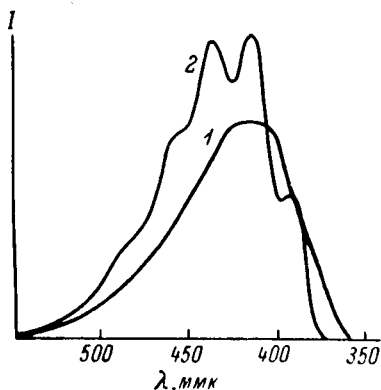


Рис. 2.6. Спектры фосфоресценции гуанозина (1) и аденозина (2) (Bersohn a. Isenberg, 1963).

I — интенсивность флуоресценции (отн. ед.).

*Люминесценция пуринов и пиримидинов
при возбуждении в области около 300 ммк*

При возбуждении в области 296—313 ммк изучалась лишь флуоресценция твердых охлажденных до 90° К пуринов и пиримидинов (Агроскин и др., 1960). В этих условиях наблюдалась люминесценция как пуриновых, так и пиримидиновых оснований. Весьма интересным оказалось то, что при возбуждении в области 296—313 ммк спектры свечения тимина и урацила сдвигаются по сравнению со спектрами, возбуждаемыми в области 260—280 ммк, от 310 к 395 и от 355 к 430 ммк соответственно. Для гуанина, аденина и цитозина положение максимума свечения остается неизменным и обнаруживается при 370, 355 и 400 ммк соответственно (табл. 2.2).

Таблица 2.2

МАКСИМУМЫ СПЕКТРОВ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ТВЕРДЫХ ПРЕПАРАТОВ
ПУРИНОВЫХ И ПИРИМИДИНОВЫХ ОСНОВАНИЙ И ИХ ПРОИЗВОДНЫХ
ПРИ 90° К
(Агроскин и др., 1960)

Вещество	Область возбуждения		Вещество	Область возбуждения	
	260—280 ммк	296—313 ммк		260—280 ммк	296—313 ммк
Аденин	355	355	Цитидин-5-моно-фосфат	330	340
Аденозин	375	375	Урацил	355	430
Аденозин-5-моно-фосфат	360	350	Уридин-5-моно-фосфат	320	430
Гуанин	370	370	Уридин-5-трифосфат	330	340
Гуанозин	325	355	Тимин	310	395
Гуанозин-5-моно-фосфат	370	360	Тимидин-5-моно-фосфат	335	375
Цитозин	400	400			

Сам факт возбуждения люминесценции в области около 300 ммк, где отсутствует сколько-нибудь заметное поглощение свободных оснований, заслуживает особого рассмотрения. Необъясним в настоящее время и спектральный сдвиг флуоресценции замороженных препаратов урацила и тимина при возбуждении в различных спектральных областях.

*Люминесценция пуринов и пиримидинов
при возбуждении в области 350 ммк*

В работе Бейза и Грейста (Basu a. Greist, 1963) наряду с основным максимумом поглощения при 260—285 ммк в спектрах концентрированных водных растворов аденина, аденозина, инозина, тимизина, урацила, цитозина, тимина и гипоксантина было обна-

ружено «плечо» поглощения при 350 мкм. Интенсивность этого «плеча» увеличивается как при возрастании концентрации этих растворов, так и при увеличении их вязкости (увеличение вязкости достигалось добавлением к растворам глюкозы).

При облучении концентрированных растворов светом с длиной волны 350 мкм как в присутствии, так и в отсутствии глюкозы возникает видимая флуоресценция с максимумом при 450 мкм (рис. 2.7). Интенсивность этого свечения очень незначительна

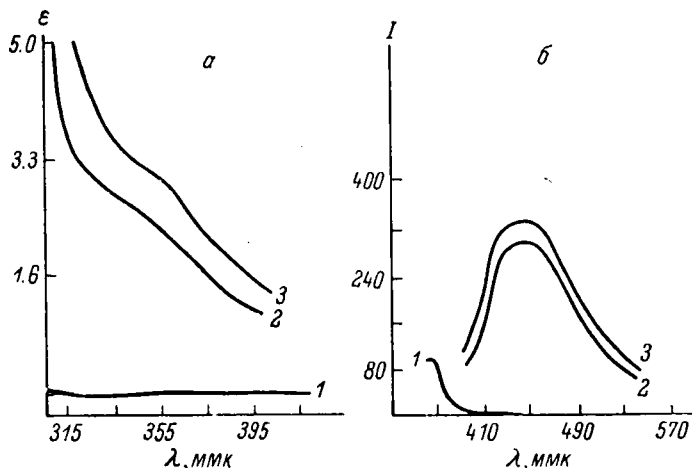


Рис. 2.7. Спектры поглощения (а) и флуоресценции (б) растворов аденозина различной концентрации (Basu a. Greist, 1963).

1 — 0.0003 М водный раствор, 2 — 0.03 М водный раствор, 3 — такой же раствор, в который добавлена сахараза. $\lambda_{\text{возб.}} = 350$ мкм. рН растворов — 7.0. Интенсивность флуоресценции (I) и коэффициент поглощения (ϵ) выражены в относительных единицах.

и в присутствии глюкозы больше, чем без нее. Выход флуоресценции увеличивается при увеличении концентрации раствора. В сильно разбавленных растворах свет той же самой длины волны не возбуждал никакой флуоресценции. Полоса свечения, наблюдаемая в концентрированных растворах, наиболее интенсивна в нейтральных средах и значительно уменьшается при рН ниже 4 и выше 8. Интенсивность рассматриваемых полос поглощения и испускания больше всего для аденозина, инозина и урацила. Бейз и Грейст приписывают эти полосы образованию в концентрированных растворах исследованных веществ молекулярных комплексов за счет взаимодействия молекул с переносом заряда.

2. 2. ЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Люминесценция нуклеиновых кислот изучена гораздо меньше, чем люминесценция белков. Основные причины этого отстав-

ния — малая интенсивность свечения и трудность получения люминесцентно чистых препаратов нуклеиновых кислот. Так же как и люминесценция азотистых оснований, свечение нуклеиновых кислот возникает при возбуждении в трех спектральных областях, при длинах волн менее 300, около 300 и в области 360—370 мкм.

*Люминесценция нуклеиновых кислот
при возбуждении в области длин волн
менее 300 мкм*

Р а с т в о р ы. Первая попытка исследования флуоресценции нуклеиновых кислот в водных растворах была сделана в работе Шора и Парди (Shore a. Pardee, 1956). Авторы изучали нейтральные водные растворы РНК вируса табачной мозаики и дрожжей, а также ДНК из спермы лосося, но не обнаружили их свечения в видимой и УФ областях спектра. Эти результаты подтвердились в работе Агроскина и др. (1961): при возбуждении в области обычного поглощения нуклеиновые кислоты не флуоресцируют в нейтральных водных растворах. В то же время Агроскин и др. (1961) обнаружили свечение растворов нуклеиновых кислот из разных источников в 0.1 н. HCl (рН 1.1). Спектральный максимум этого свечения наблюдался приблизительно при 358 мкм.

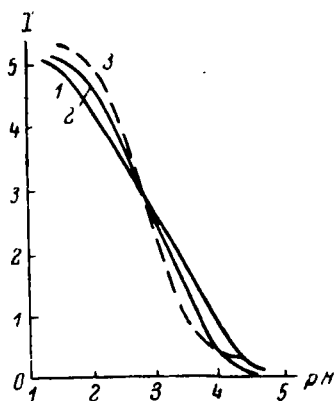


Рис. 2.8. Влияние рН среды на интенсивность флуоресценции (I) водных растворов ДНК и гуанина.

1 — низкополимерная ДНК,
2 — высокополимерная ДНК,
3 — гуанин.

Изучение спектров возбуждения и флуоресценции нуклеиновых кислот и сравнение их с соответствующими спектрами пуриновых и пиримидиновых оснований позволило авторам рассматриваемой работы прийти к заключению, что за флуоресценцию ДНК и РНК в этих условиях ответствен в основном гуанин; вклад аденина в свечение в несколько раз меньше, а пиримидины совсем не вносят вклада в свечение. С этим хорошо согласуется факт отсутствия свечения у апуриновой кислоты, в то время как апириимидиновая кислота имеет спектр свечения, сходный со спектром ДНК.

Известно, что при рН 1.1 ДНК в растворе деполимеризована (Rice a. Doty, 1957). Это обстоятельство снижает ценность полученных Агроскиным и соавторами результатов, так как они фактически наблюдали флуоресценцию продуктов деполимеризации. Поэтому Баренбойм и др. (1963) дополнительно измерили зависимость интенсивности флуоресценции ДНК от рН среды, чтобы зарегистрировать свечение высокополимерной ДНК.

Зависимость интенсивности флуоресценции низкополимерной и высокополимерной ДНК от рН среды показана на рис. 2.8. Кривая зависимости интенсивности флуоресценции ДНК от рН близко соответствует кривой для гуанина. Тот факт, что ДНК флуоресцирует только в кислой среде, Агроскин и соавторы (1961) связывают с тем, что в кислой среде флуоресцируют соли пуриновых оснований и, в частности, гуанина, который определяет флуоресценцию ДНК. Однако хлористоводородная соль гуанина в нейтральном водном растворе по нашим данным не флуоресцирует.

Вероятнее всего зависимость интенсивности флуоресценции ДНК от рН обусловлена ионизацией остатков гуанина. На рис. 2.8 видно, что флуоресценция гуанина в ДНК оказывается наполовину потушенной при рН 3, что приблизительно соответствует значению рК для гуанина (табл. 2.1). Неизвестно, какой точно группе гуанина соответствует это рК, однако предполагается (Pullman а. Pullman, 1963), что в гуанине, входящем в состав нуклеиновых кислот, это рК связано с переносом протона атома N₇. Во всяком случае точка зрения, согласно которой зависимость флуоресценции ДНК от рН среды связана с протолитической реакцией, хорошо согласуется с теми представлениями, которые развивались в предыдущем параграфе и, в частности, с результатами работы Борезена (Börresen, 1963а).

Совпадение спектров флуоресценции и возбуждения гуанина и ДНК говорит о том, что включение гуанина в состав молекулы ДНК не отражается на спектральных характеристиках его флуоресценции. Меняется ли при этом его квантовый выход — неизвестно.

В отличие от белков структура ДНК не оказывает влияния на квантовый выход флуоресценции хромофора. К этому заключению можно прийти на основании того, что переход ДНК из спиральной в клубкообразную конформацию, который происходит при рН меньше 3.5 (Сухоруков и др., 1963), практически никак не отражается на ходе кривой зависимости интенсивности свечения от рН (рис. 2.8).

Отсутствие флуоресценции растворов ДНК при возбуждении в области обычного поглощения при физиологических условиях и независимость флуоресценции нуклеиновых кислот от их структуры сильно снижают интерес к изучению флуоресценции этих соединений.

Следует указать на возможность использования УФ флуоресценции ДНК и РНК, возбуждаемой при $\lambda < 300$ мкм, для количественного анализа содержания в них гуанина и его производных. Флуоресцентный метод, в частности, был применен для количественного анализа гидролизатов РНК (Udenfriend а. Zaltzman, 1962). Известно, что в щелочных гидролизатах РНК отсутствуют заметные количества свободных оснований. В соответствии

с этим флуоресценция щелочных гидролизатов РНК была наиболее интенсивной в кислых растворах. Авторы считают, что слабая флуоресценция щелочных гидролизатов РНК при pH 11 обусловлена отщеплением небольших количеств свободного гуанина в этих условиях. Однако, основываясь на данных Борезена (Börgezen, 1963a) о свечении ГМФ в щелочных средах (см. табл. 2.1), можно объяснить свечение щелочных гидролизатов РНК присутствием этого соединения.

Кислотные гидролизаты РНК, наоборот, флуоресцируют наиболее интенсивно в щелочной среде (Udenfriend a. Zaltzman, 1962), что связано с содержанием в них больших количеств свободного гуанина. Этот вывод подтверждается также сходством спектров флуоресценции кислотных гидролизатов РНК и гуанина. Юденфренд и Зальтцман (Udenfriend a. Zaltzman, 1962) разработали флуоресцентный метод количественного анализа гуанина в гидролизатах РНК. Количество гуанина в гидролизатах образцов РНК, определенное этим методом, хорошо соответствует величинам, полученным хроматографическим методом, хотя люминесцентная методика проще, и ответ получается значительно быстрее.

Юденфренд и др. (Udenfriend et al., 1963) разработали также метод анализа небольших количеств диметиламиногуанина в присутствии больших количеств гуанина (например, в гидролизатах транспортной РНК). Этот метод состоит в исследовании флуоресценции смеси этих двух пуринов после обработки ее азотистой кислотой. При этом диметиламиногуанин не изменяется, в то время как гуанин превращается в ксантин, который в этих условиях не флуоресцирует. Этот метод дает хорошее совпадение с другими методами определения содержания диметиламиногуанина (например, хроматография).

Флуоресценция замороженных растворов. В работе Рана и др. (Rahn et al., 1964) была исследована флуоресценция ДНК и синтетических полинуклеотидов в смеси этиленгликоль—вода (1 : 1) при 77° К. В этих условиях из полинуклеотидов флуоресцируют лишь пуриновые; максимумы спектра флуоресценции поли-А и поли-Г наблюдались при 335 и 360 мкм соответственно. Интенсивность флуоресценции ДНК оказалась на порядок меньше, чем суммарная интенсивность флуоресценции составляющих ее пуриновых нуклеотидов. Ран с соавторами обнаружили, что флуоресценция полинуклеотидной цепи существенно зависит от ее структуры. Так, денатурация ДНК приводит к усилению свечения приблизительно в три раза. Зависимость флуоресценции от структуры проявилась также в экспериментах с поли-А. На рис. 2.9 представлена зависимость относительной интенсивности флуоресценции этого полимера от pH. Резкое нарушение монотонной зависимости интенсивности флуоресценции наблюдается в области pH 6.0. Ран и др. (Rahn et al., 1964) объясняют это явление кооперативным переходом поли-А от клубко-

образной одноцепочечной конформации (рН 6) к спиральной (рН < 6). Существование такого перехода при рН 6 известно из ряда работ (см., например: Steiner и Beers, 1958), а также было подтверждено в рассматриваемой работе Рана и соавторов: при рН около 6 происходит резкое уменьшение коэффициента поглощения (гипохромный эффект) при 257 мкм (рис. 2.9).

В рассматриваемой работе было показано также, что флуоресценция нуклеотидов аденина в поли-А тушится при образовании тройных спиралей, которые возникают при взаимодействии молекулы поли-А с двумя молекулами поли-У или молекулы поли-А

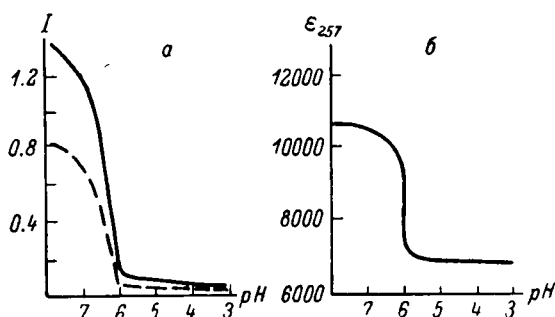


Рис. 2.9. Зависимость относительной интенсивности флуоресценции и фосфоресценции (I) и коэффициента поглощения (ϵ) полиадениловой кислоты от рН при 77° К (Rahn et al., 1964).

a — относительная интенсивность флуоресценции (пунктирная линия) и фосфоресценции (сплошная линия),
 b — коэффициент поглощения.

и двумя молекулами полиинозина. Так как спиральная конформация молекул поли-А возможна лишь при ионизированных группах NH_2 аденина, то тушение флуоресценции может быть связано с влиянием этих групп на хромофор.

Флуоресценция препаратов нуклеиновых кислот в твердом агрегатном состоянии при низких температурах. Агроскин и др. (1961) обнаружили, что если твердые препараты ДНК и РНК охладить до 90° К, то при возбуждении светом в области 260—280 мкм они флуоресцируют. При этом наблюдается широкая полоса флуоресценции, которая охватывает всю спектральную область свечения входящих в состав нуклеиновых кислот азотистых оснований. «Плечи» на кривой спектра флуоресценции нуклеиновых кислот характеризуют вклад во флуоресценцию отдельных оснований (рис. 2.5). Различие спектров флуоресценции ДНК и РНК обусловлено различием вклада в свечение тимина и урцила — тех оснований, которые являются специфичными для этих нуклеиновых кислот.

Люминесценция нуклеиновых кислот при возбуждении в области 290—313 мкм

В 1960 г. Агроскин с соавторами обнаружили флуоресценцию охлажденных до температуры жидкого кислорода твердых образцов нуклеиновых кислот под действием света 290—313 мкм (максимум спектра возбуждения около 300 мкм.) В этой же области возбуждалась флуоресценция азотистых оснований (см. табл. 2.2). Одним из самых интересных результатов этой работы было обнаружение тонкой структуры спектров флуоресценции РНК вируса

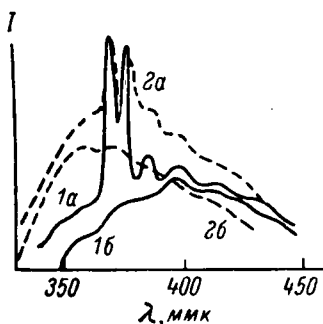


Рис. 2.10. Спектры флуоресценции препаратов РНК и ДНК (Агроскин и др., 1960).

1 — РНК вируса табачной мозаики, 2 — ДНК эритроцитов кур. а — до облучения, б — после облучения УФ в течение 30 мин. $\lambda_{\text{возб.}} = 296 - 313$ мкм. I — интенсивность флуоресценции (отн. ед.).

табачной мозаики и ДНК эритроцитов кур (рис. 2.10). Несколько позже Дузу и др. (Douzou et al., 1961) также обнаружили флуоресценцию и фосфоресценцию замороженных растворов ДНК (рис. 2.11). Важной особенностью этого свечения явилась зависимость почти всех характеристик люминесценции (спектров возбуждения и излучения, времени затухания люминесценции) от структуры молекулы и от взаимодействия с белками, в частности с гистонами (рис. 2.12—2.14). Наконец, в 1961 г. Агроскин с соавторами описали флуоресценцию растворов ДНК и РНК в 0.1 М фосфатном буфере при pH 7.2 с максимумом возбуждения при 300 мкм. Однако никаких более подробных исследований проведено не было. Понятно, что люминесценция, возбуждаемая в этой области, может представить значительный интерес для изучения

структурных превращений нуклеиновых кислот. Однако о природе ее пока не высказано никаких предположений, кроме самого общего соображения о том, что она связана со «структурными центрами».

Флуоресценция при возбуждении светом с длиной волны около 350 мкм

Бейз и Лох (Basu a. Lox, 1962) зарегистрировали «плечо» в спектре поглощения нейтральных растворов нуклеиновых кислот при 350 мкм и свечение в видимой области спектра (с максимумом при 440 мкм) при возбуждении светом в области 350 мкм (рис. 2.15). Свечение исчезает при длительной обработке растворов нуклеиновых кислот ультразвуком. Последующие работы Бейза и сотрудников (Basu a. Greist, 1963; Basu a. Lox, 1963) привели авторов

к заключению, что длинноволновое «плечо» в спектре поглощения и новая полоса флуоресценции в видимой области спектра обусловлены образованием комплексов между основаниями нуклеиновых

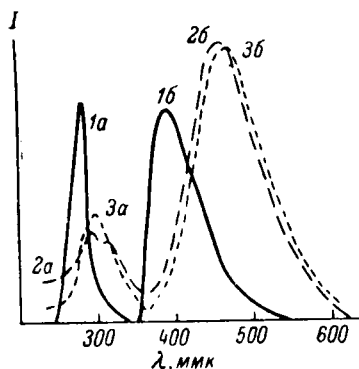


Рис. 2.11. Спектры возбуждения и излучения гистона (1), нуклеопротеида (2) и ДНК (3) (Douzou et al., 1961).

a — возбуждение, *b* — излучение.
I — интенсивность флуоресценции (отн. ед.).



Рис. 2.12. Изменения спектров возбуждения ДНК после нагревания или облучения (Douzou et al., 1961).

1 — нативная ДНК, *2* — ДНК после пребывания при температуре 40° С в течение 4 час., *3* — ДНК после облучения УФ лучами в течение 2 час. при 77° К. *I* — интенсивность люминесценции (отн. ед.).

кислот. Характер этих комплексов не ясен, хотя авторы считают, что они имеют дело с разновидностью комплексов с переносом заряда. По-видимому, нужны специальные дополнительные эксперименты, чтобы выяснить природу этого свечения, которые разумно ставить после того, как появится уверенность, что имеющиеся препараты нуклеиновых кислот достаточно чисты.

Гачковский (1960) обнаружил широкую непрерывную полосу флуоресценции твердых образцов нуклеиновых кислот при возбуждении в области около 360 мкм. Возможно, это свечение имеет ту же природу, что и свечение растворов нуклеиновых кислот при возбуждении в области 350 мкм (Basu a. Lox, 1962).

Люминесценция и чистота препаратов нуклеиновых кислот

Влияние возможных примесей. В люминесцентном анализе белков широко используются совершенные методы очистки: хроматография, электрофорез на крахмальных блоках, препаративное ультрацентрифугирование. В то же время

при люминесцентном анализе нуклеиновых кислот в значительно меньшей степени используются достижения современной препаративной биохимии: трудно указать работу, в которой была бы проведена такая очистка исследуемых нуклеиновых кислот, ко

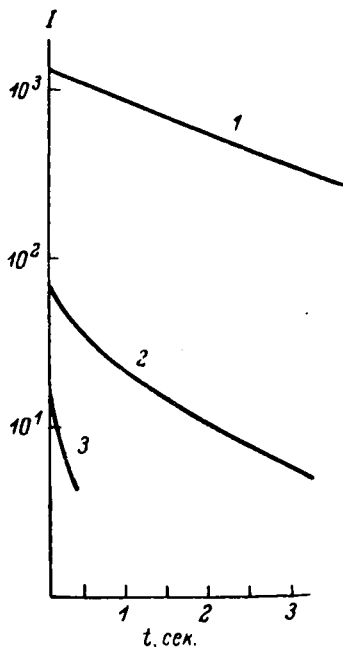


Рис. 2.13. Затухание люминесценции полинуклеотидов и ДНК (Douzou et al., 1961).

1 — полиадениловая кислота, $\lambda_{\text{возб}} = 300$ мнк, $\lambda_{\text{люм}} = 430$ мнк; 2 — полиуридилловая кислота, $\lambda_{\text{возб}} = 310$ мнк, $\lambda_{\text{люм}} = 460$ мнк; 3 — ДНК, $\lambda_{\text{возб}} = 300$ мнк, $\lambda_{\text{люм}} = 475$ мнк.

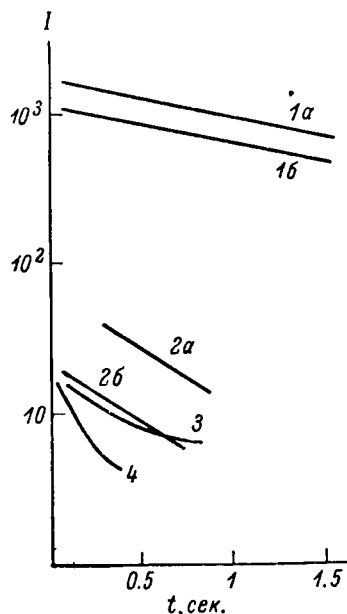


Рис. 2.14. Затухание люминесценции нуклеогистонов и ДНК (Douzou et al., 1961).

1 — гистон, $\lambda_{\text{возб}} = 280$ мнк, $\lambda_{\text{люм}} = 395$ мнк; 2 — нуклеогистон, $\lambda_{\text{возб}} = 300$ мнк, $\lambda_{\text{люм}} = 445$ мнк; 3 — нуклеогистон, $\lambda_{\text{возб}} = 335$ мнк, $\lambda_{\text{люм}} = 475$ мнк; 4 — ДНК, $\lambda_{\text{возб}} = 300$ мнк, $\lambda_{\text{люм}} = 475$ мнк. а и б — разные опыты.

торая соответствовала бы требованиям люминесцентного анализа. Интересно отметить, что, как сообщают Юденфренд и Зальцман (Udenfriend a. Zaltzman, 1962), ряд препаратов, которые были признаны «чистыми» с точки зрения обычных биохимических тестов, содержали достаточное количество примесей, чтобы заметно изменить спектры возбуждения и флуоресценции.

Кроме того, ряд примесей в нуклеиновых кислотах вообще трудно поддается очистке: достаточно вспомнить хотя бы серию работ Блюменфельда (см., например: Блюменфельд, 1959), в которых были открыты и исследованы аномальные магнитные свой-

ства ДНК, оказавшиеся впоследствии результатом связывания ионов с определенными участками ДНК, хотя последние подвергались тщательной очистке. Этот пример важен еще и потому, что ионы (атомы) железа известны как активные тушители люминесценции. Аналогичные замечания можно сделать относительно влияния на люминесценцию азотистых оснований ионов Са и Mg (Watanabe et al., 1963). Если примеси существенно влияют на люминесценцию нуклеиновых кислот, то отсюда следует вывод о том, что по люминесценции можно судить о наличии примесей. На наш взгляд, появление в спектрах возбуждения нуклеиновых кислот пика при 280 мкм может служить чувствительным индикатором присутствия в препаратах белковых примесей.

«И н д и в и д у а л ь н о с т ь» п р е п а р а т о в. Почти во всех работах, посвященных люминесценции нуклеиновых кислот, изучалось свечение «валовых», нефракционированных препаратов ДНК или РНК. Чтобы лучше понять, к чему это приводит, обратимся вновь к белкам. Изучая люминесценцию яичного альбумина, например, мы рассматриваем свечение молекул, идентич-

ных по аминокислотному составу, последовательности аминокислот и пространственной структуре. С другой стороны, измеряя флуоресценцию РНК, выделенной из дрожжей, Агроскин и др. (1961) фактически получили данные о суммарной флуоресценции смеси молекул информационных, рибосомальных и транспортных РНК, различных по составу, длине цепи и структуре. Естественно, что полученные таким образом результаты отражают закономерности, присущие довольно широкому классу молекул; молекулярная индивидуальность характеристик при этом теряется. И, наоборот, получению тонкой структуры в спектрах флуоресценции РНК, выделенной из вируса табачной мозаики, несомненно способствовало то обстоятельство, что каждая частица вируса табачной мозаики содержит всего одну молекулу РНК и, следовательно, в исследуемом растворе был набор однотипных молекул (если считать, что выделение РНК было достаточно «мягким» и не привело к значительной «ломке» молекул в процессе выделения).

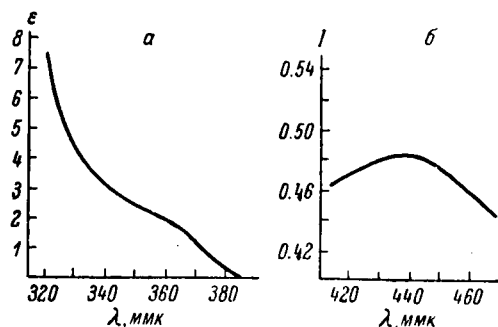


Рис. 2.15. Спектры поглощения и флуоресценции концентрированного раствора ДНК (Basu a. Lox, 1962).

а — спектр поглощения, *б* — спектр флуоресценции. Концентрация раствора — 0,8%, $\lambda_{\text{возб}} = 350$ мкм. Интенсивность флуоресценции (*I*) и коэффициент поглощения (ϵ) выражены в относительных единицах.

Кроме такой потери индивидуальности люминесцентных характеристик при работе с набором разнотипных нуклеиновых кислот, можно вообще не обнаружить люминесценции, если один или несколько типов этих макромолекул люминесцируют, но составляют при этом небольшую долю от всех остальных, нелюминесцирующих. В связи с этим представляло бы интерес, на наш взгляд, изучение флуоресценции индивидуальных фракций транспортных РНК. Повышенное содержание метилированных производных азотистых оснований в транспортных РНК (см. обзор: Баев, 1965) может привести к тому, что квантовый выход флуоресценции этих макромолекул, возбуждаемых УФ светом ($\lambda < 300$ мнк), будет заметно выше, чем у суммарных препаратов РНК.

* * *

Рассмотренный материал показывает, что люминесцентные свойства нуклеиновых кислот изучены в гораздо меньшей мере, чем люминесцентные свойства белков. Это в значительной степени обусловлено теми трудностями, с которыми сталкивается исследователь при изучении люминесценции нуклеиновых кислот (регистрация слабых световых потоков, необходимость тщательной очистки препаратов, сильное светорассеяние растворов нуклеиновых кислот).

В отношении азотистых оснований люминесцентный анализ может, по-видимому, дать ту же информацию, что и в отношении ароматических аминокислот: в первую очередь информацию об их электронной структуре и свойствах возбужденных состояний.

Спектры поглощения разных пуриновых и пиримидиновых оснований мало отличаются друг от друга, в то время как люминесцентные свойства весьма индивидуальны; это позволяет использовать люминесценцию для качественного и количественного анализа нуклеиновых кислот.

В появившихся за последнее время работах показана связь люминесценции и структуры нуклеиновых кислот.

По-видимому, большой интерес могут представить исследования люминесценции нуклеопротеидов, сведения о которой практически отсутствуют.

РАДИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ БИОПОЛИМЕРОВ И ИХ СОСТАВЛЯЮЩИХ

Под действием излучения радиоактивных источников или рентгеновского облучения люминесцируют самые разнообразные неорганические и органические вещества и среди них — белки, нуклеиновые кислоты и их составляющие. Замечания о радиолюминесценции ДНК содержатся в монографиях Тарусова (1955) и Дубинина (1964). Сапежинский и Эмануэль (1960) зарегистрировали послесвечение белков и нуклеиновых кислот под действием гамма-излучения. Зоммермайер и др. (Sommermeier et al., 1961) наблюдали люминесценцию водных растворов ароматических аминокислот под действием мягкого рентгеновского излучения (7 кэв). Аналогичную люминесценцию кристаллического и растворенного триптофана в более жестких условиях возбуждения (60 кэв) исследовали Баренбойм и Доманский (1963). Оженстин и др. (Augenstein, Carter et al., 1964), Картер и др. (Carter et al., 1965) изучили рентгенолюминесценцию порошков ароматических аминокислот и белков.

Наблюдаемое свечение обусловлено целым рядом различных по механизму процессов, возникающих в результате взаимодействия рентгеновского или гамма-излучения с веществом. Поэтому, прежде чем рассматривать основные закономерности и характеристики радиолюминесценции, необходимо, хотя бы коротко, познакомиться с сутью этих процессов и оценить их вклад в свечение.

3.1. ПЕРВИЧНЫЕ И ВТОРИЧНЫЕ ПРОЦЕССЫ ВОЗБУЖДЕНИЯ

Распространение рентгеновского и гамма-излучения в среде сопровождается взаимодействием излучения с веществом. Известно свыше десятка различных типов элементарных реакций гамма-лучей с веществом, вероятность которых зависит от энергии фотона и некоторых физических характеристик вещества (Fano, 1953a).

Образование низкоэнергетических электронов

В большинстве радиобиологических экспериментов используется излучение с энергией 0.01—2 Мэв; основными процессами взаимодействия в этом диапазоне энергии являются фотоэффект и комптоновское рассеяние (Hine a. Brownell, 1956), в результате которых образуются вторичные электроны первого поколения. Эти электроны в дальнейшем способны к упругому и неупругому рассеянию. Последний эффект может приводить к ионизации и возбуждению молекул, а также к образованию радиационного тормозного излучения (для веществ с плотностью, близкой к единице, в рассматриваемом интервале энергий потерями на радиационное тормозное излучение можно пренебречь: Нелипа, 1960).

Ионизация вторичными электронами первого поколения приводит к образованию вторичных электронов следующего поколения; некоторые из них, в свою очередь, способны производить ионизацию и возбуждение. При облучении рентгеновскими квантами с энергией 100 кэв число ионизаций вторичными электронами в 600 раз больше числа ионизаций, производимых непосредственно рентгеновскими квантами (Morrisson, 1952). Если первичная частица — электрон, то на долю вторичных электронов приходится примерно половина всех ионизаций (Lea, 1959).

Вторичные электроны имеют различные энергии: от тепловой до энергии первичной частицы. Условно вторичные электроны подразделяют на быстрые, которые способны производить ионизацию и возбуждение (δ -электроны, $E > 100$ эв), и медленные, не способные к ионизации молекул (Fano, 1953a). Большую часть вторичных электронов составляют медленные: только 5% имеют энергию больше 100 эв, и 1% — больше 500 эв (Charlesby, 1960). Таким образом, в результате взаимодействия излучения с веществом образуется большое количество низкоэнергетических электронов, которые, как будет показано дальше, играют основную роль в процессе возбуждения молекул.

Прямое возбуждение

Электроны всех поколений при неупругом столкновении могут вызывать возбуждение молекул среды. В отличие от фотонов электроны могут возбудить молекулу, имея любую энергию, превышающую энергию возбуждения.

Истинный механизм процессов возбуждения электронами сложных молекул в конденсированной фазе неизвестен. Однако в ряде работ при рассмотрении процесса возбуждения применяются законы, выведенные для газов.* В этом случае вероят-

* Такая простая экстраполяция может быть недостаточной для объяснения событий, происходящих в конденсированной системе (Fano, 1961; Lipski, 1964).

ность оптически разрешенных переходов молекулы (атома) под действием электрона в возбужденное состояние n определяется эффективным поперечным сечением Q_n , которое зависит от свойств молекулы (атома) и от кинетической энергии T электрона (Hart a. Platzman, 1961):

$$Q_n = \frac{4\pi a_0 R^2}{T} \left(\frac{f_n}{E_n} \right) \ln(C_n T), \quad (3.1)$$

где a_0 — Боровский радиус водорода, R — постоянная Ридберга, C_n — постоянная, зависящая от уровня возбуждения, f_n — сила осциллятора электронного уровня с энергией E_n .

Из формулы (3.1) следует, что могут иметь место лишь оптически разрешенные переходы. Вероятность таких переходов с ростом кинетической энергии электрона вначале растет, достигает максимума и затем монотонно убывает. Расчет по формуле (3.1) показывает, что возбуждение производят в основном низкоэнергетические электроны.

Вероятность возбуждения электронного уровня определяется силой осциллятора (точнее отношением f_n/E_n). У ароматических аминокислот площадь под кривой поглощения (и, следовательно, сила осциллятора) в области 120—240 мкм много больше, чем в области 240—300 мкм. Это означает, что у ароматических аминокислот электроны в основном возбуждают уровень, соответствующий полосе поглощения 120—240 мкм.

Сила осциллятора пептидной связи в белках в области 120—240 мкм меньше, чем, например, у триптофана. Однако значительно большее число пептидных связей в белке по сравнению с числом остатков ароматических аминокислот приводит к тому, что, по-видимому, значительная доля энергии, привносимой ионизирующим излучением, идет на возбуждение пептидных связей. Если учесть при этом, что миграция энергии с пептидной связи на остатки ароматических аминокислот не происходит (Владимиров и Конев, 1959), а сама пептидная связь не люминесцирует, то можно понять, почему выход радиолуминесценции белков много меньше выхода аминокислот. Так, по данным Оженстина и др. (Augenstein et al., 1964), энергия, затрачиваемая на излучение одного фотона триптофановыми остатками трипсина, приблизительно в 60 раз больше энергии, требующейся на высвечивание одного фотона свободным триптофаном.

Формула (3.1) не отражает того, что существенной особенностью прямого возбуждения молекул электронами является возможность возбуждения оптически запрещенных переходов. Купперман и Раф (Kupperman a. Raff, 1964), например, наблюдали при возбуждении низкоэнергетическими электронами два запрещенных перехода в молекуле этилена, один из которых синглет-триплетный ($S-T$ -переход).

Один из возможных механизмов увеличения вероятности возбуждения запрещенных $S-T$ -переходов состоит в обмене электрона молекулы на падающий электрон (Пшежецкий, 1962). В ходе такого обмена может произойти изменение кратности уровня, если спиновые моменты падающего и выбитого электронов противоположно направлены. Вероятность возбуждения запрещенного перехода имеет резкий максимум для электронов с энергией, соответствующей энергии перехода; при больших кинетических энергиях электрона вероятность резко падает, так как обмен электронов зависит от времени взаимодействия (Пшежецкий, 1962).

Вторая возможная причина, обуславливающая повышенную вероятность образования возбужденных триплетных состояний, состоит в том, что при возбуждении вторичными электронами образуется относительно большое число высших возбужденных синглетных уровней. В то же время существует представление, что для высших уровней возбуждения вероятность перехода на триплет больше, чем для низших уровней (Robinson a. Frosh, цит. по: Augenstein et al., 1964). Это представление было подтверждено экспериментально (O'Dwyer et al., 1962).

Наконец, повышенная вероятность образования триплетных уровней может быть связана с тем, что высокоэнергетические частицы с малой длиной пробега (например, быстрые δ -электроны) производят на своем пути большое число ионизированных и возбужденных молекул, которые поэтому сильно локализованы и образуют группы («кластеры»). Предполагается, что сильное взаимодействие возбужденных молекул в кластерах увеличивает вероятность изменения кратности уровня (Fano, 1961).

Таким образом, при возбуждении ионизирующим излучением должно наблюдаться увеличение числа триплетных возбужденных уровней по сравнению с числом их при фотовозбуждении. В эксперименте это приводит к усилению фосфоресцентного компонента в спектре радиolumинесценции по сравнению со спектром фотolumинесценции (Augenstein, Carter et al., 1964).

Вторичные процессы

При первичных процессах возбужденные молекулы образуются в результате непосредственного взаимодействия электрона с молекулой.* Остальные пути возбуждения можно отнести ко вторичным, хотя по времени некоторые из них (например, рекомбинации ион—электрон) могут произойти раньше, чем возбуждение электроном последнего поколения, еще обладающим для этого достаточ-

* В принципе электрон также может возбуждать ионизированные молекулы и другие вторичные продукты.

ной энергией. Рассмотрим кратко косвенные пути возбуждения молекул.

Рекомбинация положительных ионов с электронами. Этому процессу должны способствовать следующие два обстоятельства: эффект «клетки» Франка—Рабиновича, препятствующий уходу макромолекулярного иона, и малый пробег электрона в конденсированном веществе.

Рекомбинация положительных ионов с электронами может приводить к образованию как синглетных, так и триплетных возбужденных состояний. Бак (Buck, 1960) указывает, что при этом в 75% случаев образуются триплетные возбужденные состояния и лишь около 12% рекомбинаций ведут к образованию синглетных возбужденных состояний.

Расчет, проведенный Розманом и Килиным (1959), показывает, что большинство ионов в конденсированной фазе рекомбинирует за 10^{-12} сек., что делает практически неразличимыми свечение при рекомбинации положительного иона и электрона и свечение, обусловленное прямым возбуждением электронами.

Другой разновидностью рекомбинации с участием положительного иона может быть тройное соударение, в результате которого возбужденной оказывается другая частица (например, в жидкой фазе — растворитель).

Реакции свободных радикалов. Ионизация молекул приводит к образованию свободных радикалов, неспаренный электрон которых обуславливает их высокую реакционную способность: радикалы активно рекомбинируют между собой, атакуют нейтральные молекулы, взаимодействуют с кислородом и т. д. Часть реакций с участием свободных радикалов, образованных действием рентгеновского и гамма-излучения на белки и нуклеиновые кислоты, приводит к образованию возбужденных молекул (стр. 102 и 104).

Кроме процессов рекомбинации электронов с ионами и реакций с участием радикалов, существуют и другие вторичные процессы, которые в принципе могут вносить вклад в свечение: рекомбинация противоположно заряженных стабильных ионов, захват электрона нейтральной молекулой; однако роль этих процессов в возбуждении незначительна (см. обзоры: Пшежецкий, 1962; Баренбойм, 1963а).

3.2. РАДИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ И ЕЕ ОСНОВНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

По механизму возникновения свечение, индуцируемое ионизирующей радиацией, можно подразделить на три основных вида:

1. Свечение, возникающее в результате прямого возбуждения молекул среды вторичными электронами — радиолюминесцен-

ция, которая в дальнейшем будет рассмотрена более подробно.*

2. Свечение Вавилова—Черенкова, возникающее при движении электрона в среде со скоростью, превышающей скорость света в этой среде, и люминесценция, индуцируемая свечением Вавилова—Черенкова. Минимальная энергия электрона, вызывающего свечение Вавилова—Черенкова, определяется показателем преломления среды и для водных растворов белков, например, составляет около 140 кэв.

Свечение Вавилова—Черенкова и индуцированная им люминесценция могут иметь значительную интенсивность. Чижикова (1961) отмечает, что интенсивность радиолюминесценции растворов органических сцинтилляторов становится сравнимой с интенсивностью свечения Вавилова—Черенкова в этой среде (возбуждение гамма-излучением Co^{60}) лишь при сравнительно больших концентрациях растворов (10^{-3} г/мл). При этом отношение интенсивностей люминесценции, возбуждаемой непосредственно электронами и индуцированной излучением Вавилова—Черенкова, колеблется от 0.27 до 6.25 в зависимости от вещества и растворителя.

3. Свечение, возникающее в результате косвенного возбуждения при вторичных процессах (см. раздел 3.1), которое можно определить как радиохемилюминесценцию. Наиболее подробно изучено свечение, связанное с реакциями свободных радикалов.

Сапежинский и др. (1963), Сапежинский, Силаев и Донцова (1964), Сапежинский, Силаев и Эмануэль (1964, 1965) показали, что эффект послесвечения при рентгеновском облучении растворов различных белков (трипсин, рибонуклеаза, гемоглобин и пр.) связан с рекомбинацией перекисных радикалов белка. Аналогичный эффект в растворах ДНК связывают с гидроперекисями тимина (Эмануэль и др., 1965; Жижина и др., 1965). В принципе можно допустить существование такого свечения и для клеток. В связи с этим интересно отметить работу Брумберга и Барского (1960), в которой авторы наблюдали появление видимой флуоресценции после облучения мертвых клеток (фиксированный препарат) рентгеновским и УФ излучением. Эффекта не было при облучении сухих клеток, но свечение появилось при погружении их в воду. Похожий эффект свечения при растворении предварительно облученных рентгеновыми лучами веществ отмечен для белков (Сапежинский и др., 1963) и для сахара, крахмала и глюкозы, подвергшихся воздействию гамма-облучения (Westermarck a. Crapendieser, 1960). Эффект послесвечения при облучении растворов белков связан в работе Сапежинского с образованием

* Термин «радиолюминесценция» будет употребляться в дальнейшем вне зависимости от вида ионизирующего излучения, использующегося для возбуждения.

и рекомбинацией перекисных радикалов белка. Соответственно и в работе Брумберга и Барского (1960) при добавлении сильных акцепторов кислорода свечение исчезало.

Свечение вещества, возникающее под действием ионизирующего излучения, характеризуется в первую очередь спектральным распределением, длительностью и энергетическим выходом. К сожалению, по этим параметрам часто невозможно различить радиolumинесценцию и свечение, возникающее в результате вторичных процессов. Так, например, радиolumинесценция и высвечивание за счет рекомбинации положительных ионов с электронами (см. раздел 3.4) происходят с нижних возбужденных уровней и поэтому спектрально неразличимы. Эти два вида свечений неразличимы также по времени затухания, так как время рекомбинации ион—электрон (10^{-12} сек.) ничтожно по сравнению с временем жизни нижнего возбужденного состояния (10^{-9} сек.).

Радикалы, образующиеся из сложных органических молекул, могут иметь продолжительность жизни, много превышающую длительность затухания флуоресценции и даже фосфоресценции биополимеров и их составляющих. Сам процесс рекомбинации радикалов также может проходить за время, большее времени жизни флуоресценции. Поэтому вклад этого процесса в общую интенсивность свечения, вызываемого ионизирующим излучением, определяется не только фактическим световым выходом, но и временем измерения: при регистрации одиночных сцинтилляций хемилуминесцентные процессы практически не проявятся, однако при измерении интенсивности радиolumинесценции в течение длительного времени вклад их может быть велик.

Из приведенных данных следует, что хотя радиolumинесценция определена как конкретный физический процесс, методически ее трудно отделить от сопутствующих свечений, связанных со спецификой взаимодействия ионизирующего излучения с веществом.* Поэтому в литературе под радиolumинесценцией часто понимают совокупность свечений с длительностью порядка длительности фотофлуоресценции. Радиolumинесценция в этом случае обусловлена главным образом процессом истинного возбуждения молекул электронами и процессом рекомбинации ион—электрон.

Спектральная характеристика радиolumинесценции

Сравнение спектров фото- и радиolumинесценции органических сцинтилляторов показывает, что при комнатной температуре они совпадают (Чижикова, 1961; Birks, 1964; Birks et al., 1964). Аналогичный результат получили Баренбойм и Доманский (1963)

* В особых условиях таким сопутствующим свечением, кроме рассмотренных выше, может быть термolumинесценция, индуцированная рентгеновским или гамма-излучением (подробнее см. стр. 142).

при возбуждении мягким рентгеновским излучением (60 кэв) порошка триптофана (рис. 3.1). Однако Оженстин и др. (Augenstein, Carter et al., 1964), возбуждая люминесценцию кристаллических порошков триптофана жестким рентгеновским излучением (230 кэв), обнаружили длинноволновый сдвиг максимума * (приблизительно на 15 мкм по сравнению с фотолюминесценцией) и дополнительный максимум в области около 600 мкм.

Совпадение спектров фото- и радиолуминесценции означает, что в обоих случаях излучение происходит с одних и тех же энергетических уровней. С другой стороны, возможно возбуждение ионизированных молекул и других вторичных продуктов взаимодействия излучения с веществом, нижние синглетные уровни которых смещены относительно уровня основной нейтральной молекулы. Это, естественно, приведет к сдвигу спектра люминесценции.

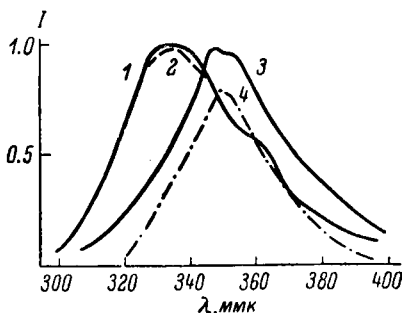


Рис. 3.1. Спектры флуоресценции триптофана.

1, 2 — кристаллический триптофан: 1 — возбуждение УФ лучами, 240—280 мкм, 2 — возбуждение рентгеновскими лучами, 60 кэв; 3, 4 — раствор триптофана в спирте, $5 \cdot 10^{-4}$ М: 3 — насыщенный азотом, 4 — насыщенный кислородом; в обоих случаях возбуждение рентгеновскими лучами 60 кэв. I — интенсивность флуоресценции (отн. ед.). Масштаб по оси ординат для спектров 1 и 2 — различен, для спектров 3 и 4 — одинаков.

Возможно также образование новых центров свечения примесного типа, где в роли примеси выступает ион (Birks, 1964). Наконец, рядом авторов (Kallman et al., 1955; Беликова, 1959) при комнатной температуре зарегистрировано свечение, связанное, по мнению этих авторов, с существованием триплетных уровней, образование которых под действием ионизирующего излучения происходит в значительно боль-

шем количестве, чем при фотовозбуждении (см. раздел 3.1).

В цитированной выше работе Оженстина с соавторами (Augenstein, Carter et al., 1964) сравнивались спектры свечения порошков ароматических аминокислот и трипсина, возникающего под действием рентгеновского (230 кэв) и УФ излучения при температуре жидкого азота. Некоторые экспериментальные результаты этой работы представлены в табл. 3.1.

У тирозина и трипсина максимумы свечения во второй полосе близки при фото- и рентгеновозбуждении. Для триптофана и

* УФ излучение возбуждает люминесценцию с поверхности, рентгеновское излучение — во всем объеме порошкообразного вещества. Поэтому условия отражения и рассеяния света люминесценции при этих двух видах возбуждения различны. Эта разница может объяснить наблюдаемый сдвиг спектра, так как в работе Чижиковой (1961) различные условия многократного отражения и рассеяния света люминесценции приводили к сдвигу спектра.

фенилаланина максимум свечения при возбуждении рентгеновским излучением сдвинут в красную область. У триптофана этот максимум оказался двухкомпонентным, причем один компонент не исчезал при комнатной температуре.

Каша (Kasha, 1964) высказал предположение, что сдвиг спектров, обнаруженный в работе Оженстина и др. (Augenstein, Carter et al., 1964), может быть связан с радиационно-химическими изменениями в веществе под действием рентгеновского излучения и предложил сравнить спектры фотолюминесценции до и после облучения рентгеновскими квантами.

По спектральным характеристикам, полученным Оженстиным и др. (Augenstein, Carter et al., 1964), можно сравнить соотношение коротковолнового и длинноволнового компонентов спектра люминесценции при возбуждении рентгеновским и УФ излучением (табл. 3.1). Отношение площадей под первой и второй поло-

Таблица 3.1

СРАВНЕНИЕ ХАРАКТЕРИСТИК ФОТО- И РАДИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ НЕКОТОРЫХ ВЕЩЕСТВ ПРИ НИЗКОЙ ТЕМПЕРАТУРЕ (Augenstein, Carter et al., 1964)

Вещество	1-я полоса спектра (флуоресценция) ($\lambda_{\max}$)		2-я полоса спектра (фосфоресценция) ($\lambda_{\max}$)		Отношение площадей под 1-й и 2-й полосами спектра		Энергия, поглощаемая на один высвеченный квант (эВ)
	при фотовозбуждении (F)	при радиовозбуждении (R_1)	при фотовозбуждении (P)	при радиовозбуждении (R_2)	F/P	R_1/R_2	
Триптофан . . .	330	355	490	510—560	1.5	1.5	68
Тирозин	300	320	450	450	1.5	0.013	109
Фенилаланин . .	295	310	415	500	4.5	0.11	147
Трипсин	330	355	445	455	4.5	0.5	4000

сой высвечивания в случае рентгеновского (R_1/R_2) и фотовозбуждения (F/P) одинаковы только для триптофана. Для других веществ $R_1/R_2 < F/P$.

Последнее хорошо согласуется с тем, что при возбуждении электронами удельное количество триплетных состояний много больше, чем при фотовозбуждении.

В 1960 г. Сапежинский и Эмануэль зарегистрировали после-свечение замороженных растворов яичного альбумина, ДНК и РНК под действием гамма-излучения. Так как спектры и кинетика затухания этого свечения совпадали с аналогичными данными при фотовозбуждении, то авторы пришли к выводу, что наблюдаемое ими свечение представляет собой гамма-фосфоресценцию. Однако методика, которой пользовались авторы, не позволяла обнару-

жить гамма-флуоресценцию исследуемых объектов и поэтому сравнить эти данные с результатами Оженстина и др. (табл. 3.1) нельзя.

Время жизни радиолюминесценции

Как было показано в разделе 3.1, процессу радиолюминесценции предшествует образование тех же возбужденных синглетных состояний, что и при фотовозбуждении. Казалось бы, это должно привести к равенству $\tau_{\text{фото}}$ и $\tau_{\text{радио}}$ — длительностей фото- и радиолюминесценции.

Экспериментальное определение значения τ проводилось для различных органических сцинтилляторов, однако единого мнения как о соотношении величин $\tau_{\text{фото}}/\tau_{\text{радио}}$, так и характере затухания радиолюминесценции до сих пор нет (Liebson et al., 1950; Чижикова, 1961; Birks, 1964).

Галанин и Чижикова (1961) получили хорошее совпадение $\tau_{\text{фото}}$ и $\tau_{\text{радио}}$ для антрацена и нафталина путем сравнения затухания импульсов гамма-сцинтилляций и импульсов, возбуждаемых электрической искрой. На этом основании Чижикова (1961) считает, что соотношение между вероятностями излучательных и безызлучательных переходов, определяющее величину квантового выхода, одинаково при фото- и радиовозбуждении. Другая группа авторов (Килин и Розман, 1963; Килин и др., 1964) показала, что при возбуждении ионизирующим излучением жидких и твердых растворов возникает специфическое тушение, приводящее к значительному сокращению длительности свечения (в некоторых случаях более чем в три раза). Наличие дополнительного тушения флуоресценции триптофана и тирозина, возникающего при действии мягкого рентгеновского излучения, наблюдали Баренбойм и Доманский (1963). Из этих работ следует, что выход люминесценции с нижнего возбужденного синглетного уровня при фотовозбуждении выше, чем при возбуждении ионизирующим излучением из-за действия специфического тушителя в последнем случае. Такие представления, развиваемые Килиным и др. (1964), могут быть полезны при изучении механизма взаимодействия ионизирующего излучения с органическими веществами, в частности, при установлении соотношения между длительностью и выходом фото- и радиолюминесценции.

Исследование низкотемпературного послесвечения биологических объектов проводилось в работах Сапежинского и Эмануэля (1960) и Оженстина и др. (Augensteyn, Carter et al., 1964). В первой работе зарегистрирована гамма-фосфоресценция белка и нулеиновых кислот, причем τ фосфоресценции были идентичны для каждого из них при фото- и гамма-возбуждении. Однако время жизни, полученное Сапежинским и Эмануэлем для белка, $\tau=6.6$ сек., более чем в два раза превышает общепринятую величину (Debye a. Edwards, 1952). Этот факт и сопоставление данной

работы Сапежинского и Эмануэля с более поздними (Сапежинский, Силаев и Эмануэль, 1964, 1965) дают некоторые основания предполагать, что в случае послесвечения белка и нуклеиновых кислот авторы могли иметь дело также и с хемилюминесценцией, возникающей в процессе облучения.

В работе Оженстина и других было обнаружено, что затухание послесвечения ароматических аминокислот (кроме фенилаланина) и трипсина есть сумма двух экспоненциальных затуханий, связанных, по-видимому, с двумя длинноволновыми компонентами спектра. При фотовозбуждении фосфоресценция ароматических аминокислот тоже оказалась состоящей из двух экспонент, однако времена ее затухания, как и суммарное затухание, отличны от времени затухания под действием рентгеновского излучения.

3.3. ВЫХОД РАДИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ

Одной из наиболее важных характеристик радиолюминесценции является энергетический выход — отношение энергии, высвеченной в радиолюминесценции $E_{\text{рл}}$, ко всей поглощенной $E_{\text{погл}}$:

$$B = \frac{E_{\text{рл}}}{E_{\text{погл}}} . \quad (3.2)$$

Из предыдущего параграфа ясно, что в это определение можно вкладывать различный смысл в зависимости от того, что понимается под радиолюминесценцией, т. е. под величиной $E_{\text{рл}}$ в формуле (3.2). Высвечиваемая под действием ионизирующего излучения энергия $E_{\text{рл}}$ складывается из энергий высвечиваемых с нижнего синглетного и триплетного уровней ($E_s + E_t$), образованных путем прямого возбуждения электронами (радиофлуоресценция и радиофосфоресценция) и из суммы энергий E_p , высвечиваемых в результате всех прочих процессов, сопровождающих истинную радиолюминесценцию (люминесценция в результате рекомбинации положительных ионов с электронами, рекомбинации радикалов и т. д.). Следовательно,

$$B = \frac{E_s + E_t + \Sigma E_p}{E_{\text{погл}}} = B_s + B_t + \Sigma B_p . \quad (3.3)$$

Значение каждого из выходов определяется вероятностями процессов, предшествующих образованию соответствующего возбужденного состояния и вероятностью излучения с этого уровня. В обширной литературе, посвященной сцинтилляционным счетчикам (см. обзор: Birks, 1964), обычно определяют выход радиолюминесценции при комнатной температуре за время, соизмеримое со временем жизни сцинтилляций в условиях, когда спектры радио- и фотолюминесценции совпадают и практически отсутствует послесвечение. В этих условиях основной вклад в выход радио-

люминесценции, по-видимому, будет вносить прямое возбуждение и процессы рекомбинации электронов с ионами, приводящие к испусканию с нижнего возбужденного синглетного уровня. Для этого случая энергетический выход радиолюминесценции можно выразить следующим образом:

$$B = \rho q, \quad (3.4)$$

где ρ — доля поглощенной энергии, приводящей к образованию нижнего синглетного состояния, q — квантовый выход фотолюминесценции вещества. При анализе данных, полученных по формуле (3.4) следует учесть, что вероятности излучательных переходов с нижнего синглетного уровня при радио- и фотовозбуждении различаются из-за появления дополнительного тушения, специфического для радиофлуоресценции (стр. 106), поэтому значения B при расчете по формуле (3.4) могут быть несколько завышены.

При возбуждении гамма-излучением величина ρ для растворов самых различных веществ, исследованных Чижиковой (1961), колеблется в сравнительно небольших пределах около среднего значения $\rho = 3.9\%$. Если принять, что для растворов ароматических аминокислот $\rho = 3.9\%$, то у триптофана, тирозина и фенилаланина, квантовые выходы фотолюминесценции которых, по данным Тила и Вебера (Teale a. Weber, 1957), равны 20, 21 и 3.5%, значения выхода B равны соответственно 0.78, 0.82 и 0.137%. Выходы радиолюминесценции растворов белков, которые, по-видимому, как и выходы фотолюминесценции определяются остатками ароматических аминокислот, также должны быть низкими. Еще более низким следует ожидать значение B для нуклеиновых кислот, выход фотолюминесценции которых, по данным Агроскина и др. (1961), не превышает 1%.

Для определения энергетического выхода радиолюминесценции можно использовать три метода. При первом измеряется средняя интенсивность люминесценции вещества при непрерывном облучении его пучком частиц или квантов, и одновременно определяется поглощенная энергия. При втором — импульсном методе — измеряется световая энергия, выделяющаяся при отдельной сцинтилляции, вызываемой электроном с известной энергией. В случае гамма-излучения Co^{60} , например, сцинтилляции вызываются комптоновскими электронами, энергия которых может быть рассчитана. Наконец, может быть произведено определение относительного выхода по сравнению с веществом, абсолютный энергетический выход которого уже был определен одним из двух указанных выше методов. В принципе для определения энергетического выхода биополимеров и их составляющих могут быть использованы все три метода, хотя сцинтилляционная способность этих молекул никем не проверялась и возможно, что в соответствующем эксперименте встретятся непреодолимые

трудности. На практике пока были использованы только два метода: Оженстин и др. (Augenstein, Carter et al., 1964) определили абсолютный выход радиолуминесценции глубоко охлажденных порошков ароматических аминокислот и сухих белков,* а Баренбойм и Мочалкин (1966) выполнили измерения относительным методом.

По данным Оженстина и др. (Augenstein, Carter et al., 1964), на квант, излученный по всей области эмиссии, приходится 147, 109 и 68 эв поглощенной энергии для фенилаланина, тирозина и триптофана соответственно, а на квант, излученный в пике флуоресценции, 1400, 8350 и 110 эв для этих же аминокислот. Судя по приведенным в этой работе значениям пиков флуоресценции (310, 320 и 355 мкм), энергетический выход в пике флуоресценции составляет 0.32, 0.05 и 3.55% для фенилаланина, тирозина и триптофана. По величинам квантовых выходов, которые равны 0.04, 0.21 и 0.2 (Teale a. Weber, 1957), легко определить, что для этих аминокислот величины энергии, приводящие в итоге к возбуждению одной молекулы до нижнего синглетного уровня, составляют 56, 1670 и 22 эв. Так как величина энергии, затрачиваемая на возбуждение нижнего синглетного уровня при фотолюминесценции, равна около 4.5 эв, то фактически для возбуждения этого уровня у фенилаланина, тирозина и триптофана используется соответственно 0.08, 0.003 и 0.2 поглощенной энергии излучения. Эти данные находятся в качественном соответствии с нашими: интенсивность радиофлуоресценции порошка тирозина была много меньше интенсивности фенилаланина, в то время как для растворов наблюдалось обратное соотношение. В работе Баренбойма и Мочалкина (1966) энергетический выход раствора триптофана сравнивался с выходом раствора сернокислого хинина, для которого Чижиковой (1961) была определена величина ρ . Все измерения производились при возбуждении мягким рентгеновским излучением (60 кэв); в этом случае растворы обладают сравнительно большой интенсивностью радиолуминесценции и в то же время отсутствует маскирующее влияние излучения Вавилова—Черенкова. Путем расчетов результаты приводились к энергиям, соответствующим энергии излучения Co^{60} . Из этих

* Определение энергетического выхода по методу, избранному Оженстиным и другими, требует измерения поглощенной дозы падающего излучения и абсолютных фотометрических измерений интенсивности испускаемого света. Известно, что значения выхода люминесценции, полученные для порошкообразных веществ, не представляют собой истинного квантового выхода, так как в порошках неизбежно многократное отражение и рассеяние света, приводящие к реабсорбции люминесценции. Экспериментально это показано, например, Чижиковой (1961) путем сравнения данных для порошков и кристаллов. Поэтому для порошков обычно используют специальные методы измерений и расчетов (Аленцев и Винокуров, 1951), применение которых в случае радиолуминесценции затрудняется тем, что проникающая радиация вызывает свечение всей массы порошка.

экспериментов следует, что для триптофана в растворе при облучении Co^{60} энергетический выход не должен превышать 0.26%. Различия в значениях B , полученных для триптофана в работе Оженстина и др. (Augenstein et al., 1964), с одной стороны, и Баренбойма и Мочалкина (1966), с другой, могут зависеть от разных причин, основные из которых следующие: различный квантовый выход фотолюминесценции в порошках и в растворах и различные значения энергии ионизирующего излучения, которым соответствуют значения B в каждом из этих случаев.

Энергетический выход радиолуминесценции пропорционален квантовому выходу фотолуминесценции (3.4). В свою очередь, для порошкообразного фенилаланина $q \approx 1$ (Yeagers a. Augenstein, 1965), в то время как в растворе $q = 0.04$. Это резкое возрастание квантового выхода связывается с существованием агрегации, уменьшающей тушение при столкновении, с отсутствием тушения люминесценции при переносе энергии и т. п., словом, с процессами, специфичными, по мнению авторов, для твердой фазы. Поэтому можно полагать, что и для порошкообразного триптофана значение q может быть больше, чем для его раствора, что и могло привести к увеличению величины B для порошкообразного триптофана.

Различия в значениях B , полученных для триптофана в цитируемых работах, могут быть также связаны с различными энергиями рентгеновского и гамма-излучений, которым соответствует определенная величина B . Сильное влияние энергии первичного ионизирующего излучения на выход радиолуминесценции показано многочисленными исследованиями* (см. обзоры: Kallman a. Furst, 1958; Чижикова, 1961; Birks, 1964).

3.4. РАДИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ И РОЛЬ ВОЗБУЖДЕННЫХ СОСТОЯНИЙ В РАДИОБИОЛОГИИ

Изучение радиолуминесценции позволяет судить о роли возбуждения в первичных процессах биологического действия ионизирующего излучения.

Реализуется ли энергия возбуждения в лучевом поражении или весь эффект обусловлен ионизацией? Вопрос этот обсуждается в литературе давно (Lea, 1959), однако и до сих пор, по мнению

* Анализ литературных данных, произведенный Баренбоймом и Мочалкиным (1966), показал, что в интервале энергий 0.06—1.2 Мэв в первом приближении выход будет расти прямо пропорционально удельной потере энергии и обратно пропорционально величине энергии. Следовательно, значение B , полученное при гамма-возбуждении (1.2 Мэв), необходимо увеличить

в $\frac{1.2}{0.23} = 5.2$ раза и затем сравнивать с величиной B , полученной при рентгеновозбуждении (0.23 Мэв). Приведенные к одной энергии (0.23 Мэв) значения выхода для триптофана составляют 3.55 и 1.35%, т. е. оказываются достаточно близкими.

некоторых исследователей, «роль актов возбуждения в лучевом поражении клетки не ясна» (Эйдус, 1964; стр. 21).

Участие энергии возбуждения в лучевом поражении определяется следующими факторами: 1) распределением энергии между актами ионизации и возбуждения; 2) характером процессов, в которых реализуется возбуждение: растрата энергии возбуждения малыми порциями по многочисленным степеням свободы биополимеров или высвечивание могут привести к безвредным для организма энергетическим потерям, в то же время преимущественное образование триплетных форм может стимулировать радиационно-химические процессы.

Обе названные проблемы (распределение энергии и характер процесса) для конденсированных фаз экспериментально пока не решены. Считается, что около половины всей поглощенной конденсированной фазы энергии расходуется на образование возбужденных молекул и ионов (см. обзор: Баренбойм, 1963а), однако экспериментально это показано только для газов (Williams a. Essex, 1949), а распространение полученных при этом закономерностей на концентрированную фазу не всегда правомочно (стр. 98). Для паров органических веществ Розман и Килин (1959) экспериментально нашли, что отношение числа возбужденных (N_e) и ионизированных (N_i) молекул равно 3. По предположениям Плацмана и Франка (Platzmann a. Frank, 1958), в конденсированной фазе $N_e/N_i \approx 1 \div 2$; к этим же значениям приводит ориентировочный расчет для белков и нуклеиновых кислот (Баренбойм, 1963а). Если считать, что в среднем 42.5% всей массы клетки составляют биополимеры со связанной непосредственно с ними водой (Кузин, 1958), то на долю таких комплексов придется 42.5% всей поглощенной энергии ионизирующего излучения; половина этой энергии пойдет на возбуждение. Если довериться этим весьма примерным оценкам, то доля поглощенной биополимерами энергии достаточно велика, что заставляет обратить особое внимание на пути ее реализации.

Прежде всего правомерно поставить вопрос: какая доля этой энергии высветится? Бартон (Burton, 1961), например, предполагает, что доля высвечиваемой энергии велика и потому тушение кислородом люминесценции существенно влияет на степень поражения. Конлайн и Мюллер (Kohnlein a. Muller, 1962) отметили, что ароматические аминокислоты требуют на образование одного свободного радикала под действием гамма-облучения энергию на 1—2 порядка больше, чем алифатические, что, в частности, может быть связано с большими потерями на высвечивание. Аналогичные данные получил Мочалкин (1965).

Определенный по данным Оженстина и др. (Augenstein, Carter et al., 1964) выход радиolumинесценции сухого глубоко охлажденного трипсина составляет 0.097%; по ориентировочным оценкам и экспериментальным данным, полученным для раствора трип-

тофана (стр. 110), но приложенным к белкам, эта величина не превышает 0.26%. Таким образом, наличие радиolumинесценции не скажется заметным образом как на общем энергетическом балансе поглощенной энергии, так и на балансе энергии, пошедшей на возбуждение. На основании полученных величин энергетических

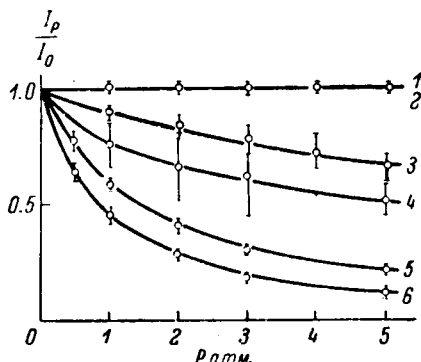


Рис. 3.2. Влияние различных газов на фото- и радиофлуоресценцию (ФФЛ и РФЛ) растворов триптофана.

0.01 М раствор триптофана в 0.075 н. спиртовой щелочи. По оси абсцисс — давление газа (в атм.), по оси ординат — значения $\frac{I_p}{I_0}$, где I_0 — интенсивность флуоресценции в присутствии азота (для ФФЛ) или гелия (для РФЛ) при давлении 1 атм., I_p — интенсивность флуоресценции в среде азота (гелия) при давлениях больших 1 атм. или в среде кислорода (окси азота) при любых давлениях. 1, 2 — ФФЛ и РФЛ в присутствии азота и гелия; 3 — РФЛ, тушитель — окись азота; 4 — ФФЛ, тушитель — окись азота; 5 — РФЛ, тушитель — кислород; 6 — ФФЛ, тушитель — кислород.

выходов радиolumинесценции можно утверждать, что во всяком случае в растворах биополимеров высвечивание практически не играет существенной роли среди первичных процессов реализации поглощенной энергии излучения при достаточной жесткости последнего (более 1 Мэв). Следовательно, большая часть энергии возбуждения будет реализована в различных безызлучательных процессах, среди которых внимание ряда авторов (см. обзор: Баренбойм, 1963а) привлек процесс возможной активации синглет-триплетного перехода под действием кислорода.

Известно, что эффективность действия ионизирующего излучения, как правило, возрастает в присутствии кислорода, который является естественным радиосенсибилизатором; аналогичное действие производит окись азота (см., например, обзор: Щепотьева и др., 1959).

На этом основании эффект сенсибилизации был связан с парамагнитностью молекул кислорода и окиси азота (Howard-Flanders, 1957; Kihlman, 1958; Howard-Flanders a. Jockey, 1960). Рид (Reid, 1957), а затем Мезон (Mason, 1959) гипотетически связали сенсибилизирующий эффект кислорода с тем, что его парамагнитная молекула увеличивает вероятность внутренней конверсии возбужденной молекулы на триплетный уровень. Аналогичные точки зрения на роль возбужденных состояний в кислородном эффекте были высказаны и другими авторами (Powers et al., 1960; Шехтман, 1960; Zimmer, 1961). Образование долго живущей и бирадикальной молекулы в триплетном состоянии (или хромофора макромолекулы в триплетном состоянии) инициирует, по мнению Мезона, денатурацию белка или, по замечанию Каша (Kasha, 1960), образование перекисей. В фотохимических реакциях

образование перекисей, связанное с влиянием кислорода на синглет-триплетный переход, было обнаружено экспериментально во многих случаях (см. обзор: Карякин, 1961).

Увеличение вероятности синглет-триплетного перехода при действии кислорода должно привести к тушению флуоресценции (Геренин, 1947; Карякин, 1961). Поэтому тушение кислородом флуоресценции, вызываемой рентгеновским или гамма-излучением, может служить методом, позволяющим проверить гипотезу об участии возбужденных состояний в кислородном эффекте. Тушение кислородом радиолюминесценции органических сцинтилляторов измерялось в ряде работ (Килин и Розман, 1963; Schram, 1963; Birks, 1964; Килин и др., 1964). Для ароматических аминокислот, обуславливающих свечение белков, эта работа была выполнена авторами этой книги (Баренбойм, 1963а, 1963б; Баренбойм и Доманский, 1963). На рис. 3.2 показано влияние кислорода и других газов в различных концентрациях на интенсивность флуоресценции, возбуждаемой рентгеновским излучением. Наблюдаемое тушение радиофлуоресценции — процесс физически не связанный с химическим процессом окислительной деструкции, в результате которой могли бы образовываться нефлуоресцирующие продукты радиолиза. Одним из доказательств этого служит факт неизменности интенсивности свечения при возбуждении рентгеновским излучением за время, вполне достаточное для проведения измерения (рис. 3.3).

Тушение флуоресценции можно охарактеризовать зависимостью коэффициента тушения K от концентрации тушителя C . В свою очередь $K = \frac{I_0}{I_p}$, где I_0 и I_p — интенсивности флуоресценции в бескислородной среде и в присутствии заданной концентрации кислорода (рис. 3.4). Линейная зависимость коэффициента тушения K от давления кислорода P позволяет, для характеристики процесса, ввести понятие скорости тушения K_r , характеризующей изменение коэффициента тушения при изменении давления тушителя на 1 атм.*

$$K = K_r P + 1. \quad (3.5)$$

* Показано (Баренбойм, 1963а), что в условиях описываемых опытов скорость тушения связана только с константами реакций флуоресценции f , перехода молекулы в триплетное состояние под действием кислорода t и взаимодействия с внешним тушителем k : $K_r = \frac{t}{f + k}$.

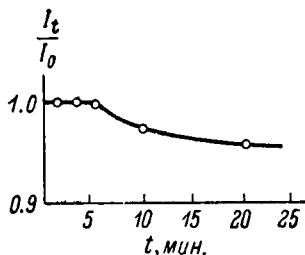


Рис. 3.3. Изменение интенсивности радиофлуоресценции при непрерывном облучении рентгеновскими лучами и постоянном давлении кислорода (1 атм.).

По оси абсцисс — длительность облучения (мин.), по оси ординат — отношение интенсивности флуоресценции в данный момент времени (I_t) к интенсивности в начальный момент времени (I_0).

Значения K_t для ароматических аминокислот, некоторых белков, нуклеиновых кислот и гуанина можно найти в ряде работ (Баренбойм, 1963а, 1963б; Баренбойм и Доманский, 1963). Отдельные примеры представлены в табл. 3.2.

В табл. 3.2 и на рис. 3.2 и 3.4 видно, что при давлении кислорода, соответствующем парциальному в атмосфере (154 мм рт. ст.), кислород практически не влияет на флуоресценцию,

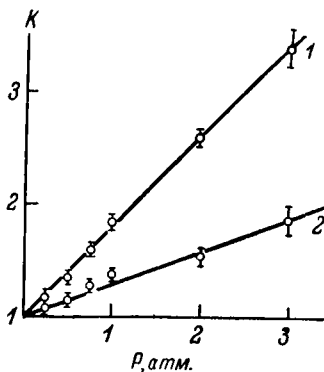


Рис. 3.4. Тушение кислородом рентгенофлуоресценции растворов триптофана и тирозина в 0.075 н. спиртовой щелочи.

По оси абсцисс — давление кислорода (в атм.), по оси ординат — коэффициент тушения. 1 — триптофан, $5 \cdot 10^{-3}$ М, 2 — тирозин, $5 \cdot 10^{-2}$ М. Кривые тушения для растворов триптофана с концентрацией в пределах $1 \cdot 10^{-3}$ — $5 \cdot 10^{-2}$ М лежат в пределах доверительных границ прямой 1.

хотя при высоких давлениях процессы тушения эффективны и достаточно хорошо описываются теорией, развитой Терениным (1947). Интерполяция данных к величинам нормального парциального давления кислорода в воздухе и расчеты на основании экспериментально определенных величин K_t (см., например: Баренбойм и Доманский, 1963) показывают, что прямое взаимодействие кислорода с молекулами, находящимися на возбужденном синглетном уровне, не вносит существенного вклада в эффект радиационного поражения.

Таким образом, эксперименты, изложенные выше, не подтверждают гипотезу Мезона. Означает ли это, что возбуждение не вносит никакой роли в радиационные эффекты? Для ответа на этот вопрос часто используют сравнение между действием радиоактивного излучения и ультрафиолетового света. Ли (Lea, 1959), например, качественно сравнив действие этих двух видов облучения на инактивацию вирусов и бактерий, пришел к выводу о малой роли

возбуждения по сравнению с ионизацией. Эту же точку зрения разделяют Грей (Grey, 1955), Бак и Александр (Bacq a. Alexander, 1961). При этом не учитывается характер возбуждения: преимущественное возбуждение при действии электронов триплетных состояний, показанное экспериментально, приводит к тому, что химические последствия радиационного возбуждения могут быть значительно больше (см. стр. 99, 100, 105).

Другим обычно используемым доказательством отсутствия роли возбуждения в радиационном эффекте служит тот факт, что порог начала инактивации ферментов (трипсина, химотрипсина) соответствует энергии частицы (или фотона), равной приблизительно 10 эв и близкой к потенциалу ионизации атомов белковой молекулы (Pollard et al., 1955; Setlow et al., 1957; Setlow,

Таблица 3.2

ТУШЕНИЕ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ АРОМАТИЧЕСКИХ АМИНОКИСЛОТ
И КАЗЕИНА ПРИ ДЕЙСТВИИ КИСЛОРОДА И ОКИСИ АЗОТА

Флуоресцирующее вещество	Раствори- тель	pH	Туши- тель	Вид воз- буждения	Скорость тушения (K_T)
Триптофан, раствор	C_2H_5OH	9.5	NO	Рентген	0.23
	C_2H_5OH	9.5	NO	УФ	0.50
	C_2H_5OH	9.5	O_2	Рентген	0.17
	C_2H_5OH	9.5	O_2	УФ	0.28
	Вода	10.5	O_2	Рентген	0.06
Триптофан, порошок	—	—	O_2	»	0.02
Тирозин, раствор . . .	C_2H_5OH	9.5	O_2	»	0.06
Фенилаланин, порошок	—	—	O_2	»	0.03
Казеин, раствор . . .	Вода	10.5	O_2	»	0.04,
Казеин, порошок . . .	—	—	O_2	»	0.03

1958). Однако электроны могут интенсивно возбуждать пептидную связь (см. раздел 3.1), причем возбуждение электроном синглетных уровней пептидной связи приведет к тому, что эффект будут производить электроны с энергиями, близкими к 10 эв. Это предположение гипотетично, но оно основывается на реальных физических закономерностях радиoluminesценции. Поэтому для того чтобы величина порога инактивации 10 эв могла служить критерием преимущественной роли ионизации, необходимо исключить это предположение путем теоретических расчетов или экспериментальной проверки.

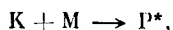
В последнее время относительная роль ионизации и возбуждения рассмотрена в работах Оженстина и его соавторов (Augenstein, 1963; Augenstein, Brustad a. Mason, 1964). Экспериментальные результаты изучения влияния температуры, при которой происходит облучение ферментов на выход их инактивации (Augenstein, 1962), не могут быть поняты только при учете ионизации, но хорошо объясняются эффектами, связанными с возбуждением (Augenstein, 1963; Augenstein, Brustad a. Mason, 1964). Различные пути реализации энергии этого возбуждения на физическом и химическом уровне подробно анализируются в последней из названных работ.

Таким образом, проблема роли возбужденных состояний в радиационном воздействии на биологические объекты остается по-прежнему открытой.

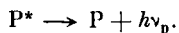
ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ КЛЕТОК И ОРГАНИЗМОВ

Многие биохимические реакции имеют экзотермические стадии, идущие с выделением энергии. В таких реакциях, как правило, присутствуют молекулы с избытком энергии, т. е. молекулы, находящиеся в неравновесно возбужденных состояниях. Энергия возбуждения складывается из энергии теплового эффекта и энергии активации (рис. 4.1). Дезактивация возбуждения осуществляется различными физическими путями, в том числе и через световое излучение — хемилюминесценцию.

Весь процесс хемилюминесценции можно разделить на две стадии (Васильев, 1965а): образование возбужденного продукта P^* из исходных реагентов K и M :



и переход возбужденной молекулы P^* в основное состояние P с испусканием фотона:



Интенсивность хемилюминесценции может быть выражена через скорость реакции, если на каждой стадии процесса окажется возможным найти квантовый выход хемилюминесценции $\eta_{x,l}$ (Васильев, 1965а):

$$\eta_{x,l} = \eta_p \eta_p^*,$$

где η_p^* — квантовый выход возбуждения: отношение числа возбужденных молекул к общему числу молекул, образовавшихся в результате реакции; η_p — квантовый выход испускания: отношение числа молекул, излучивших энергию, к общему числу возбужденных молекул P^* .

Тогда

$$I = \eta_{x,l} w,$$

где I — интенсивность хемилюминесценции: число фотонов, излучаемых единицей объема реагирующей системы в единицу вре-

мени; w — скорость реакции: число молекул продукта, образующихся за единицу времени в единице объема.

Практическая возможность измерения интенсивности хемилюминесценции зависит от скорости химического процесса, вероятности возбуждения и испускания, а также от чувствительности приемника света.

Биохимические процессы, как известно, проходят в жидкой фазе. Общие физико-химические закономерности хемилюминесценции в жидкофазных реакциях подробно исследованы Васильевым и изложены в ряде работ (Васильев, 1964а, 1964б, 1965а, 1965б, 1965в; Аллабутаев и др., 1965). Эти закономерности в общем виде приложимы и к процессам свечения, возникающего в ходе биохимических реакций, которое условно можно разделить на три основных типа: 1) темновая хемилюминесценция, побочно возникающая в метаболических и сопряженных с метаболизмом реакциях или в деструктивных процессах;* 2) функциональная хемилюминесценция, связанная с наличием специальных систем, функций которых является продукция света; 3) наведенная хемилюминесценция, возникающая в результате предварительного облучения объекта.

Хотя свечение всех трех типов является биологической люминесценцией, исторически только за вторым из них закрепилось название биолуминесценция.

4.1. ТЕМНОВАЯ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ

Многочисленными исследованиями было показано, что самые различные живые объекты обнаруживают слабое свечение в видимой и ультрафиолетовой областях спектра, не обладая при этом специальной системой для производства света (см. обзоры: Владимиров и Литвин, 1965; Журавлев, Веселовский и Кошеченко, 1965; Баренбойм, 1966).

* Определение «темновая» — весьма условно. В какой-то степени оно противопоставлено здесь определению «наведенная». Однако не менее условным является термин «сверхслабая хемилюминесценция» (об этом термине см. стр. 177). Вряд ли также следует называть это свечение «спонтанным», так как оно сильно зависит от внешних условий (см. раздел 4.1).

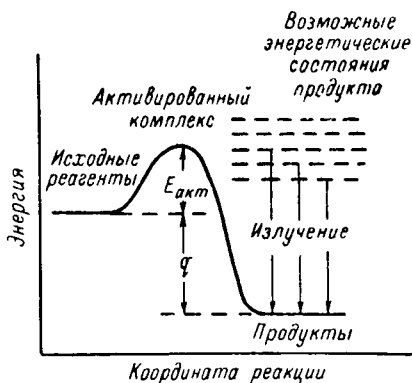


Рис. 4.1. Схема возникновения люминесценции в экзотермической реакции (Васильев, 1964б)

$E_{\text{акт}}$ — энергия активации, q — тепловой эффект.

Таблица 4.1

ИНТЕНСИВНОСТЬ ТЕМНОВОЙ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ РАЗЛИЧНЫХ ОБЪЕКТОВ

Объект	Фон (имп./мин.)	Интенсивность свечения (имп./мин.)	Температура (°C)	Литература
Печень мыши (вскрыта брюшная полость)	20—25	90—110	38	Тарусов, Поли- вода и Журав- лев, 1961a, 1961b; Тару- сов и др., 1962
Гомогенат печени мы- ши	15—20	55—65	50	
Спиртовой экстракт ли- пидов печени мыши	50—60	100	60	
Эфирный экстракт липидов печени мышы	50—60	280—340	60	
	50—60	69—72	30	
Смесь спиртового и эфирного экстрактов липидов печени мы- ши с окисляющимися жирами	50—60	1500—1600	60	
Олеиновая кислота {	60—80	860—1200	60	
	22—27	39—52	30	
Липиды человека:				Журавлев, Фи- липпов и Си- монов, 1965a
из коры головного мозга	16—29	690—760 *	60	
из сердца	16—29	1320—1480 *	60	
из печени	16—29	180—230 *	60	
из почек	16—29	850—1015 *	60	
Стебли проростков пшеницы	1500—1800	5000 *	43	Агавердиев и Тарусов, 1965
Гомогенат печени кры- сы:				Владимиров, Литвин и Тань Мань-ци, 1962
в растворе Рингера	30	500	—	
в сахарозе	10	50	—	
Митохондрии печени крысы	20	200	—	Владимиров и Львова, 1964
Жидкая культура пив- ных дрожжей	10—12	46 **	—	Конев, Троиц- кий и Кати- бников, 1961
Синхронизированная культура <i>Tetrahymena</i> <i>lys</i>	—	200 **	—	Конев, Лыско- ва и Нисенба- ум, 1965

Таблица 4.1 (продолжение)

Объект	Фон (имп./мин.)	Интенсив- ность свечения	Темпе- ратура (°C)	Литература
Скелетная мышца ля- гушки:				Троицкий, Ко- нев и Катиб- ников, 1961
покоящаяся . . .	9—8	0	—	
раздробленная . .	9—8	20 **	—	
Сокращающееся серд- це лягушки	9—8	35 **	—	
Реакция окислитель- ного дезаминирова- ния глицина под действием H_2O_2 . . .	—	480000 ***	—	Гурвич, Еремеев и Карабчиев- ский, 1965

Примечание. В тех случаях, где температура не указана, сведения о ней в работах отсутствовали. Значения интенсивности свечения, отмеченные одной звездочкой, пересчитаны в имп./мин. · см²; отмеченные двумя звездочками — выражены в процентах превышений над фоном; отмеченные тремя звездочками — выражены в фотон/мин. · см².

Некоторое представление о темновой хемилюминесценции различных объектов можно получить из табл. 4.1.

Интенсивность хемилюминесценции в таблице выражена в числе импульсов за минуту, которые возникают на выходе фотоэлектронного умножителя, регистрирующего излучение хемилюминесценции. Интенсивность пересчитана на 1 см² площади объекта. Получаемая величина может быть на один-два порядка ниже истинного значения интенсивности (фотон/мин. · см²), так как при этом не учитывается телесный угол сбора света и эффективность счета. Измерение интенсивности хемилюминесценции в имп./мин. · см² без поправок на технические условия измерения не позволяет сравнивать между собой данные различных авторов. По-видимому, следует проводить такой пересчет или «привязывать» измерения на разных объектах к определенной величине — например, к интенсивности хемилюминесценции олеиновой кислоты в стандартных условиях.

Исторически сложилось так, что изучение темновой хемилюминесценции в видимой и в УФ областях спектра происходило практически независимо друг от друга, в основном на разных объектах и во многих случаях даже различными методами. И только в последнее время предпринимаются попытки найти общие черты в механизмах свечения в этих двух областях спектра.

Хемилюминесценция в видимой области спектра

Такое свечение было обнаружено впервые у высших растений Колли и Фацчини (Colli a. Facchini, 1954; Colli, Facchini a. Rossi, 1954; Colli et al., 1955) и у млекопитающих Тарусовым и др. (1961а). Дальнейшими исследованиями было установлено, что основная часть суммарного свечения в этой области обусловлена реакциями, связанными с неферментативным окислением липидов кислородом (Журавлев, Филиппов и Симонов, 1964, 1965а, 1965б; Журавлев, Веселовский и Кощенко, 1965; Тарусов и Журавлев, 1965).*

Липиды являются важными биохимическими компонентами клетки, составляя в ней до 40 % от веса всех органических веществ. Образующиеся из жиров при помощи липаз жирные кислоты служат вторым по значению после углеводов источником энергии в организме.

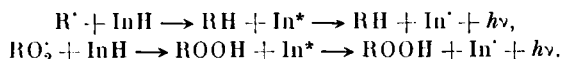
Данные по хемилюминесценции некоторых объектов, свечение которых связывают с окислением липидов, представлены в табл. 4.1. Свечение липидов занимает широкую спектральную область от синей до инфракрасной полосы. В частном случае было показано совпадение максимумов спектров хемилюминесценции олеиновой кислоты и гомогената печени в области 400 и 460 мкм (Иванов и Петрусевич, 1965). Свечение почти всегда зависит от температуры, рН среды и концентрации кислорода (Веселовский и др., 1963; Гасанов и Мамедов, 1963).

Механизм свечения. Известно, что свободные липиды способны интенсивно окисляться кислородом. Тот факт, что в клетке происходит не прямое, а ферментативное окисление липидов, связан с наличием в клетках антиокислителей, которые тормозят цепные реакции окисления липидов, обеспечивая стационарный режим их протекания (Журавлев, Поливода и Тарусов, 1961). Таким образом, неферментативное окисление липидов кислородом оказывается как бы сопряженным с метаболическим (ферментативным). Антиокислители представляют собой вещества липидной природы (Журавлев, 1959; Witting, 1965). К их числу относятся некоторые фосфолипиды, такие как токоферолы, лецитины и т. д.

Реакцию между веществами-антиокислителями в клетке и свободными перекисными радикалами, которые возникают при не-

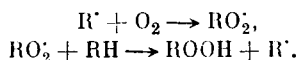
* Отметим также серию работ (Казначеев, Кузнецов и Субботин, 1964; Казначеев, 1965; Казначеев, Артемьев и др., 1965; Казначеев, Иванов и др., 1965; Казначеев, Каменская и др., 1965; Казначеев, Куликова и Старинкин, 1965), в которых было обнаружено фотоэлектрическим методом видимое свечение клеток крови и некоторых других объектов. Однако молекулярные механизмы этого свечения авторы не анализируют.

ферментативном окислении жиров, вначале авторы считали одним из основных источников свечения (Журавлев, Поливода и Тарусов, 1961; Журавлев и Веселовский, 1963; Попов и Тарусов, 1963, 1964). При этом принималось, что за испускание фотона ответственной возбужденная молекула антиокислителя InH , которая в итоге превращается в радикал, не способный инициировать цепную реакцию

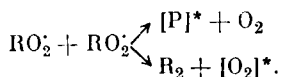


Позже, под влиянием представлений, развиваемых Васильевым (1964а, 1965а), те же авторы (Журавлев, Филиппов и Симонов, 1964, 1965а, 1965б; Журавлев, Веселовский и Кощеенко, 1965; Тарусов и Журавлев, 1965) предложили механизм хемилюминесценции липидов в биологических системах, учитывающий возможность миграции энергии возбуждения на вещество—активатор, не участвующее в реакции, но способное высвечивать фотон. Таким веществом является, например, эргостерин, добавление которого к окисленной олеиновой кислоте не меняет скорость автоокисления последней, но усиливает свечение (Журавлев, Филиппов и Симонов, 1965б). Роль активаторов могут играть и некоторые антиокислители (Журавлев, Веселовский и Кощеенко, 1965). Общая схема реакций, обсуждаемых в последних работах, выглядит следующим образом:

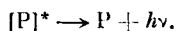
1. Ценная реакция окисления жиров:



2. Рекомбинация с образованием возбужденных состояний:



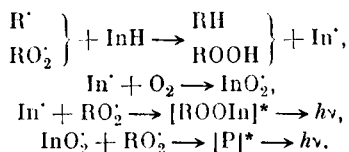
3. Люминесценция при отсутствии активатора:



4. Люминесценция с активатором (А):



5. Люминесценция при реакции с антиокислителем (InH):



При этом антиокислители, по гипотезе авторов, не только прерывают цепную реакцию в липидах, но и защищают активатор от перекисных радикалов. Эта схема при кажущейся наглядности не решает вопроса о механизме хемилюминесценции в видимой области спектра, а лишь намечает некоторые возможные пути реакций.

Отметим, что разрушение клеток при электролизе также приводит к хемилюминесценции, которую связывают с взаимодей-

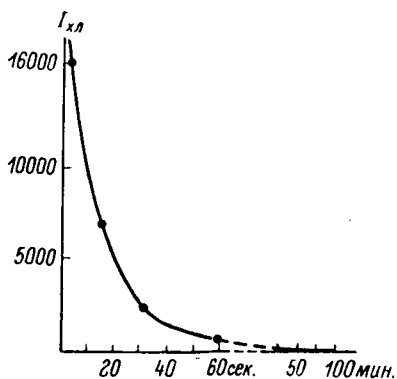


Рис. 4.2. Свечение гомогената печени крысы после добавления перекиси водорода.

По оси ординат — интенсивность хемилюминесценции (в имп./сек.), по оси абсцисс — время, прошедшее с момента добавления перекиси.

ствием антиокислителей и радикальных продуктов электролиза (Пятенко и Тарусов, 1964). Однако механизм свечения в последнем случае, по-видимому, не обязательно связан с антиокислителями: люминесценция при электролизе возникает у самых различных органических кислот, солей и т. п. (см. обзор: Васильев, 1965б), у различных ароматических соединений (Hercules, 1964). В частности, интенсивное свечение возникает при электролизе растворов тирозина, фенилаланина, гистидина и триптофана (Петрусевиц и Иванов, 1965).

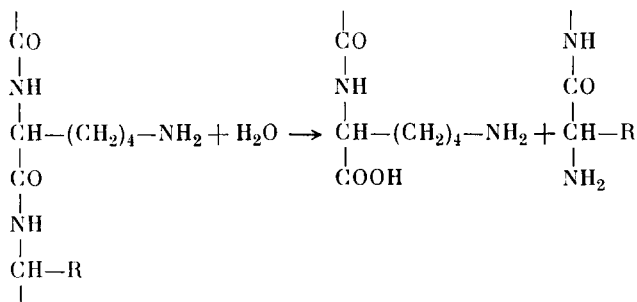
Владимиров и др. (1962) предположили, что в основе механизма темновой хемилюминесценции могут лежать другие биохимические

реакции, связанные, например, с ферментативными процессами. Так, по их мнению, разложение ферментами перекисных соединений, образующихся в ходе метаболизма в клетке, и в первую очередь разложение перекиси водорода каталазой и пероксидазой сопровождается свечением. Однако, по данным Лихтенштейна и Пурмалья (1965), свечение в этой реакции не связано с ферментативной деятельностью каталазы, а вызывается процессами окислительного взаимодействия H_2O_2 с определенными группами апофермента. Возможно, что этими же причинами вызвано свечение при реакции взаимодействия пероксидазы с перекисью водорода (Cormier a. Dure, 1963; Dure a. Cormier, 1963a, 1963b, 1964), которое, по мнению Владимиров и др. (1962), возникает в результате ферментативного процесса.

Таким образом, каталаза и пероксидаза в реакциях разложения перекисных соединений определяют скорость распада перекиси, продукты распада которой в свою очередь вступают во взаимодействие с белковой частью фермента. Тем самым действие каталазы и пероксидазы оказывается связанным со свече-

нием. Аналогичное свечение при взаимодействии H_2O_2 с различными белками наблюдали Конев и др. (1961), Сапежковский, Силаев и Донцова (1965) и на гомогенате печени крысы Новиков (неопубликованные данные; рис. 4.2).

Гусар и др. (1965) сообщают, что наблюдали свечение в результате исключительно фермент-субстратного взаимодействия в двух системах: сахаразы—инвертазы и казеин—трипсин. Конкретный механизм такого свечения представить пока трудно. Оба фермента гидролизуют субстрат. Трипсин, как известно, расщепляет пептидные связи вблизи от основных аминокислот, аргинина и лизина (Бреслер, 1963):



Энергия разрыва пептидной связи составляет около 69.7 ккал/моль (Pullman а. Pullman, 1963), энергия образования карбоксильной группы — около 90 ккал/моль (Венедеев и др., 1962), энергия активации гидролиза казеина трипсином — около 12 ккал/моль (Bull, 1947). В то же время энергия высвеченного фотона составляет около 60 ккал/моль, что значительно превышает суммарный результат приведенных значений энергий.

К сожалению, нам остались неизвестны методические подробности обсуждаемой работы Гусара и др. (1965). Однако, если реакция происходила в присутствии атмосферного кислорода, то не исключено, что свечение обусловлено взаимодействием кислорода с продуктами гидролиза. По данным А. А. Гурвич (1965), ультрафиолетовое свечение ряда ферментных систем, о котором будет идти речь в дальнейшем, возникало лишь в присутствии кислорода.

Пока нельзя привести абсолютно достоверных примеров свечения ферментных систем в видимой области спектра, возникающих без участия других агентов только за счет реакции фермент—субстрат. Это может быть связано с тем, что ферменты резко снижают энергию активации реакции E . Так, в реакции разложения H_2O_2 без фермента $E=18$ ккал/моль, а с каталазой печени $E=5.5$ ккал/моль (Bull, 1947). В свою очередь величина энергии активации влияет на величину энергии возбуждения (рис. 4.1), поэтому в ряде случаев действие ферментов может привести к ис-

чезновению хемилюминесценции, наблюдаемой при тех же процессах, идущих неферментативным путем.

Таким образом, основная часть темновой хемилюминесценции в видимой области спектра — до 75% от общего свечения нативных тканевых гомогенатов (Тарусов и Журавлев, 1965) — вызвана окислением липидов, хотя в принципе вклад в свечение может вносить также окисление других веществ: например, обсуждается возможность появления темновой хемилюминесценции клетки при окислении полифенолов, хемилюминесцирующих в модельной реакции (Slawinska i Slawinski, 1964).

Локализация свечения. Липиды, как уже отмечалось, служат одним из источников энергии в клетке. Кроме того, они участвуют в построении ряда структур: клеточной оболочки, митохондриальных мембран, мембран эндоплазматической сети и др. Связано ли свечение со всеми липидами клетки или оно преимущественно обусловлено липидами, локализованными в определенных структурах, подобно тому как УФ флуоресценция клеткок связана в основном с белками митохондрий (раздел 1.6)? Это пока неизвестно. Так, Петрусевич и Конопляников (1965) на основании косвенных данных предположили, что свечение связано с липидами клеточной оболочки. Сходные данные были получены ранее Штауфом и Реске (Stauff u. Reske, 1964), хотя авторы не рассматривали вопрос о локализации в клетке веществ, ответственных за свечение. Владимиров и Львова (1964) обнаружили свечение интактных митохондрий печени крысы, которое они связывают также с окислением липидов (Владимиров и Львова, 1965). В принципе можно допустить, что механизм свечения митохондриальных липидов подобен рассмотренному выше и их свечение связано как со структурными липидами, так и с теми, которые содержатся в матриксе. В обоих случаях возможно неферментативное взаимодействие липидов с кислородом, образование перекисей и участие в реакции антиокислителей—фосфолипидов, в частности лецитина и α -токоферола, которые содержатся в митохондриях (Lehninger, 1964). По данным Владимирова и Львовой (1964), интенсивность хемилюминесценции митохондрий связана с окислительным фосфорилированием. Исключение из среды, в которой инкубировались митохондрии, любого компонента окислительного фосфорилирования (АТФ, субстратов окисления, кислорода и др.) приводило к снижению интенсивности свечения или же к его полному исчезновению. Авторы полагают, что окислительное фосфорилирование поставляет энергию для окисления липидов (в частности для активации жирных кислот).

Можно предположить, что механо-химические изменения митохондрий, связанные с окислительным фосфорилированием, влияют на хемилюминесценцию липидов через изменение конформации липопротеиновых комплексов, постулируемое, например, Ленинджером (Lehninger, 1964; см. также раздел 1.6).

*Митогенетическое излучение
(темновая хемилюминесценция
в ультрафиолетовой области спектра)*

Еще в конце 20-х годов А. Г. Гурвич обнаружил, что делящиеся клетки корешков лука, регенерирующая роговица глаза лягушки, делящиеся клетки пивных дрожжей, группы клеток организатора эмбриона, клетки крови и некоторые другие объекты слабо излучают в области 190—325 мкм (А. Г. Гурвич и Л. Д. Гурвич, 1934, 1947, 1948). Это излучение воспринималось биологическими детекторами: клетками корешков лука или дрожжевыми клетками. Стимуляция митозов у детекторов служила мерой излучения, поэтому оно получило название митогенетического.*

Однако ряд авторов (см. обзоры: Моисеева, 1960а, 1960б) приходит к выводу, что метод биологических детекторов несостоятелен, так как мало разработан и подвержен влиянию многих побочных факторов, в связи с чем ставится под сомнение существование самого явления. Однако ультрафиолетовое излучение клеток было обнаружено с помощью газоразрядных счетчиков еще в середине тридцатых годов (Родионов и Франк, 1934; Barth, 1936; Siebert u. Seffert, 1936а, 1936b; Audubert, 1938, 1939). В последние годы митогенетическое излучение с использованием счетчиков или фотоэлектронных умножителей, работающих в режиме счета фотонов, изучалось многими авторами (Becher, 1957; Владимиров и Литвин, 1959, 1965; Конев и др., 1961; Троицкий и др., 1961; Владимиров и др., 1962; Гурвич и др., 1965; Конев и др., 1965). Фотографическим методом излучение зарегистрировано Ситко (Sitko, 1960).

Механизм свечения. Источники ультрафиолетового свечения клетки пока точно не определены. Самые общие суждения высказал Рейнштоф (Reinstoff, 1960), который полагает, что главными источниками митогенетического излучения в организме служат три типа реакций: окисление, протеолиз и гликолиз. По предположению А. Г. Гурвича и его школы (см., например: А. Г. Гурвич, 1959; А. А. Гурвич, 1965; Гурвич и Еремеев, 1965) ферментативные процессы расщепления субстрата в статистически малом числе случаев заходят глубоко, т. е. возникают небольшие свободные радикалы: гидроксилы, карбонильные группы, аминокли или иминогруппы или атомы кислорода, водорода и т. д. Их рекомбинация поставляет энергию, которая поглощается и затем высвечивается окружающими молекулами. Ряд экспериментов и расчет энергетического баланса говорят в пользу этих представлений (Гурвич и Еремеев, 1965). Так как УФ излучение наблюдалось в основном в присутствии кислорода (А. А. Гурвич, 1965),

* Этим термином в настоящее время часто обозначается хемилюминесцентное излучение биологических объектов в ультрафиолетовой области, независимо от используемого детектора.

то возможно, что свечение является результатом взаимодействия с кислородом радикалов, образующихся при ферментативных процессах расщепления.

В ряде случаев можно допустить, что одни и те же реакции отвечают за свечение в видимой и УФ областях спектра. Максимум в синей части сплошного спектра может указывать на то, что часть энергии излучается в УФ области. Действительно, Конев и Катибников (1965), изучая люминесценцию корневой системы ячменя, обнаружили интенсивный максимум в области 480 мкм и слабое свечение в УФ области спектра. Любые процессы, приводящие к увеличению общей интенсивности темновой хемилюминесценции, вызовут возрастание ультрафиолетового компонента. Такое возрастание может иметь место, например, при митозе. Действительно, Брумберг и др. (1961) обнаружили в этом случае увеличение интенсивности фотOLUMИнесценции клеток. В свою очередь рост выхода фотOLUMИнесценции, по данным Васильева (1965а), пропорционально увеличивает хемилюминесценцию. Это не исключает того, что в других случаях за свечение в видимой и УФ областях спектра будут ответственны разные реакции или разные механизмы в однотипных реакциях. Так, например, А. А. Гурвич и др. (1965) при реакции окислительного дезаминирования глицина под действием перекиси водорода обнаружили свечение в видимой и УФ областях спектра и предположили, что в основе обоих видов свечения лежат различные механизмы.

В некоторых случаях в качестве источников хемилюминесценции в видимой и УФ областях спектра могут выступить взаимосвязанные реакции: если окисление липидов ведет к свечению в видимой области, то возникающие при этом альдегиды и кетоны могут окисляться, хемилюминесцируя в ближней УФ области (Russell, 1957; Березин и др., 1962).

Биологическая роль митогенетического излучения. А. Г. Гурвичем и Л. Д. Гурвич (1948; см. также: Залкинд, 1937а, 1937б, 1964) были описаны факты, показывающие, что митогенетическое излучение является необходимым условием митоза, стимулирует митоз, вызывает обратимые морфологические изменения в клетках, меняет их проницаемость и т. д.

Несмотря на критику метода биологических детекторов (Мойсеева, 1960а, 1960б; Hollander, 1960), ряд авторов (А. А. Гурвич, 1960, 1961, 1965; А. А. Гурвич и др., 1965; Еремеев, 1961) вновь подтверждает влияние ультрафиолетового излучения индукторов на митотическую активность детекторов (клетки корешков лука, дрожжевые культуры).

Обнаруженное еще в работах А. Г. Гурвича взаимное влияние растущих клеток, разделенных кварцевой перегородкой, прозрачной для УФ излучения, нашло подтверждение в исследованиях Казначеева и др. (1964) на культуре тканей фибробласта и на дрожжевых культурах в работах Кулина (1960, 1965). Совсем

недавно Конев и др. (1965) с помощью фотоэлектронных умножителей обнаружили, что максимальная интенсивность свечения синхронизированной культуры *Torula utilis* ($\lambda_{\max}=330$ мкм) соответствует периоду подготовки клетки к делению.

Косвенным доказательством влияния митогенетического излучения на живые клетки является также моделирование УФ излучения клеток светом лампы. В этих условиях обнаружено, что свет, близкий по характеристикам к «митогенетическому» излучению, активирует такие нефотобиологические процессы, как дыхание дрожжей (Galston, 1950), дробление яиц морского ежа (Kimball, 1955), выход бактериофага из клеток (Владимиров и др., 1962), фотосинтез зеленого листа, предварительно содержавшегося в темноте, и митоз эпителия охлажденной роговицы глаза лягушки (А. А. Гурвич, 1964). Конев и Лыскова (1964) газометрическим методом показали, что световой поток, равный 10^8 квант/см² · сек., при длине волны 254 мкм вызывает стимуляцию скорости гликолиза у дрожжей, а поток величиной 10^5 — 10^6 квант/см² · сек. при длине волны 280 мкм ускоряет наступление первой волны почкования в синхронизированной голодающим культуре дрожжей.

Таким образом, во многих случаях слабое УФ излучение может воздействовать на разные стороны клеточной жизнедеятельности. Означает ли это, что УФ излучение, продуцируемое живой системой, играет в ней особую роль? По нашему мнению, подобное заключение было бы преждевременным. Нет ничего удивительного в том, что УФ излучение, обладающее высокой фотохимической эффективностью, оказывает воздействие на клетку. Однако нам пока неизвестны экспериментальные доказательства того, что излучение и поглощение УФ кванта в процессе хемилюминесценции является одним из регуляторных механизмов в клетке, а не статистической флуктуацией, своего рода «помехой», оказывающей редкое и случайное воздействие на систему или отдельную реакцию. Так, например, простая констатация фактов о влиянии излучения одних клеток на другие еще не говорит о том, что подобный эффект имеет какой-либо биологический смысл. Точно так же принципиальная возможность передачи на световых частотах большого потока информации, естественно, не доказывает того, что в живых системах информация, необходимая для запуска и регуляции различных цитохимических процессов, реализуется именно этим путем, как думают Казначеев и соавторы (Казначеев, Кузнецов и Субботин, 1964; Казначеев, 1965). Не имеют пока экспериментальных оснований представления о связи митогенетического излучения и гипотетических возбужденно-неравновесных молекулярных констелляций (А. А. Гурвич, 1965). Нет пока доказательств и того, что УФ излучение, возникающее при хемилюминесценции, вносит вклад в общую энергетику клетки. Очень часто результаты измерений лишь незначительно превышают фон приемников света (Владимиров и Литвин, 1959; Троицкий и др.,

1961). В других работах, где исследовалось воздействие излучения одних клеток на другие, количественный материал мал по объему и, как правило, не содержит никакой статистической обработки объективно выбранных показателей (Казначеев, Кузнецов и Субботин, 1964; Кулин, 1965).

Решение проблемы митогенетического излучения, на наш взгляд, находится в начальной стадии. Усилия, потраченные в последнее время исследователями, убедили в существовании ультрафиолетового излучения клеток, но мало приблизили к пониманию его роли. Можно предполагать поэтому, что в ряде случаев УФ излучение клеток является частным случаем темновой хемилюминесценции, т. е. представляет собой процесс «бессмысленной» потери энергии, тем более что механизмы свечения в ряде случаев предполагаются одними и теми же. В других случаях можно ожидать, что УФ излучение оказывает случайное и ненаправленное воздействие на живую систему. Существуют ли другие возможности? Совершенствование техники регистрации сверхслабых свечений в ультрафиолетовой области спектра, успешная разработка теории хемилюминесценции, успехи молекулярной биологии за последнее время и вновь возросший интерес исследователей к изучению митогенетического излучения дают основание надеяться на окончательное решение проблемы. Будущее покажет, прав ли был Холлендер, который в рецензии на книгу А. Г. Гурвича (1959) отмечал: «Очень жаль, что эти усилия были потрачены на проблему очень трудную для исследования, более трудную, чем что-либо другое, в чем можно было бы добиться определенного успеха» (Hollander, 1960, p. 247).

Использование темновой хемилюминесценции для изучения процессов жизнедеятельности

Изучение хемилюминесценции позволяет получать разнообразные сведения о механизмах химических реакций. В частности, можно определить количество стадий в сложной реакции, константы скоростей и энергии активации этих реакций, скорость гибели свободных радикалов, роль возбужденных молекул в реакции и т. п. (Васильев, 1965а, 1965б). Параметры хемилюминесценции связаны с некоторыми характеристиками светящихся молекул: их структурой, вероятностями и энергией электронных переходов, донорно-акцепторными свойствами. Однако прежде чем можно будет перейти к таким молекулярным и квантово-механическим характеристикам в живых системах, надо установить, какие молекулы отвечают за испускание фотона. Механизмы реакций, приводящих к образованию возбужденных состояний, и вещества, ответственные за испускание света в живой клетке, пока неизвестны. Их идентификация должна явиться основной задачей исследований в области темновой хемилюминесценции, так

как отсутствие таких сведений накладывает определенные ограничения на объем информации, которую можно получить при изучении данного явления. Тем не менее использование темновой хемилюминесценции оказалось полезным при некоторых цитологических и физиологических исследованиях. Темновая хемилюминесценция позволяет судить об общем уровне физиологической активности клетки (Владимиров и Львова, 1964, 1965; Мамедов, 1965), об изменении состояния некоторых функциональных систем (нервной системы, скелетной и сердечной мышц) (А. А. Гурвич, 1964), о жизнеспособности некоторых тканей (Попов и Тарусов, 1963; Попов, 1964), о митотической активности клеток (Gawronski, 1961), о морозоустойчивости и жароустойчивости ряда культурных растений (Гасанов и др., 1963а, 1963б; Агавердиев и др., 1965а, 1965б; Агавердиев и Тарусов, 1965), о противоопухолевых и радиозащитных свойствах некоторых веществ (Исмаилова и др., 1965; Мкртчян и др., 1965; Петрусевич и др., 1965; Тарусов и др., 1965; Тхор и Козлов, 1965) и т. д.

Измеряя интенсивность хемилюминесценции в кинетическом эксперименте *in vitro*, в частных случаях удалось определить количество стадий в сложной реакции, константы скоростей и энергии активации этих стадий (Попов и Тарусов, 1963, 1964), зависимость скорости окисления от концентрации кислорода (Попов и Тарусов, 1963), активность пероксидазы (Nilsson, 1964). При электролизе ароматических аминокислот хемилюминесценция является удобным методом исследования свободнорадикальных состояний (Клипсон и др., 1965).

4.2. ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ (БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ)

В живой природе довольно часто можно наблюдать хемилюминесценцию более интенсивную, чем темновая. В отличие от темновой эта хемилюминесценция является основным результатом определенных специализированных реакций в организме.

Многочисленные исследования показали, что видимое свечение живых организмов — биолуминесценция — широко распространено. Люминесцируют некоторые бактерии, грибы, радиолярии, губки, ракообразные, насекомые, рыбы и многие другие организмы. Гарвей (Harvey, 1940, 1952) считает, что около половины типов животного мира содержат светящиеся виды. Чаще всего светящиеся виды встречаются среди морских организмов. Биолуминесценции не обнаружена среди высших растений, птиц и млекопитающих. Несмотря на такое обширное распространение биолуминесценции и многовековой интерес к ней, физико-химические процессы, лежащие в основе свечения организмов, до сих пор расшифрованы недостаточно полно.

В основе биолюминесценции, по определению Селиджера и Мак-Элроя (Seliger a. McElroy, 1960), лежит ферментативно-катализируемая реакция окисления, в которой избыточная энергия излучается в виде квантов видимого света. Как правило, окисляемым веществом служит люциферин, катализатором — люцифераза. Эти термины сложились исторически и они весьма условны: для большинства организмов состав каждого из этих компонентов различен. Соответственно различны и конкретные механизмы реакций.

В отличие от темновой хемилюминесценции, биолюминесценция изучается давно и ей посвящено много работ, в том числе ряд подробных обзоров, в которых свечение организмов получило всестороннее рассмотрение. Так, Гарвей (Harvey, 1952) дает подробное описание экологии светящихся организмов, сравнительной анатомии вырабатывающих свет структур и физиологии процесса. Некоторые анатомические, физиологические и физико-химические аспекты биолюминесценции рассмотрены Джонсоном с соавторами (Johnson, 1955; Johnson, Eyring a. Chang, 1959; Johnson, Sie a. Haneda, 1961), Николем (Nicol, 1960, 1962) и Чейзом (Chase, 1964). Мак-Элрой с соавторами подробно рассматривают биохимическую сторону процессов свечения большинства организмов (McElroy, 1960, 1961; McElroy a. Seliger, 1961, 1963). В обширном обзоре Кормьера и Тоттера (Cormier a. Totter, 1964) сделаны попытки классифицировать светящиеся организмы по типу биохимических реакций, обуславливающих свечение (Cormier a. Totter, 1964). В отечественной литературе число подобных обзоров невелико (Гринберг, 1920; Свешников, 1941; Журавлев, Веселовский и Кощенко, 1965; Баренбойм, 1966). В двух последних работах биолюминесценция рассматривается совместно с другими типами хемилюминесценции биологических объектов. Роль биолюминесценции морских организмов в свечении моря подробно освещается Тарасовым (1956). Кроме того, имеется ряд коротких и более популярных обзоров (McElroy a. Seliger, 1962a; Nicol, 1963; Gauroy a. Grive, 1964; Korten, 1964; Shimomura, 1964).

Таким образом, проблема биолюминесценции рассмотрена в литературе с разных сторон. Поэтому мы ограничимся итоговой сводкой (табл. 4.2) и рассмотрим, для иллюстрации, биолюминесцентную систему насекомых-светляков, наиболее подробно изученную; систему бактерий, свечение которых широко используется как тест для самых различных исследований, и систему гидромедуз, в основе свечения которых лежит оригинальный и мало изученный механизм.

Биолюминесценция насекомых-светляков

Механизм свечения насекомых еще не до конца выяснен, хотя ему посвящено большое число работ (см., например: Rhodes a. McElroy, 1958a; McElroy, 1960, 1962, 1963a, 1963b, McElroy

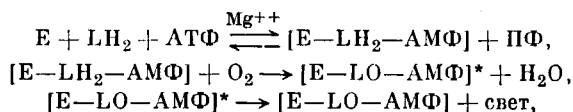
Таблица 4.2

ТИПЫ БИОЛЮМИНЕСЦИРУЮЩИХ СИСТЕМ

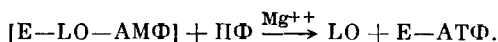
Организмы	Система реакций	Реакции, обуславливающие свечение	Максимум свечения (ммк)
Бактерии (<i>Photobacterium fisheri</i> и др.)	Пиридинуклеотидная	$1) \text{НАД}\cdot\text{H}_2 + \text{ФМН} \xrightleftharpoons{\text{НАД}\cdot\text{H}_2\text{-оксиредуктаза}} \text{ФМН}\cdot\text{H}_2 + \text{НАД}$ $2) \text{ФМН}\cdot\text{H}_2 + \text{RCHO} + \text{O}_2 \xrightarrow{\text{E}} \text{ФМН}\cdot\text{H}_2 + \text{НАД} \rightarrow \text{свет}$	465—495
Грибы (<i>Omphali flava</i> и др.)	То же	$1) \text{НАД}\cdot\text{H}_2 + \text{L} \xrightleftharpoons{\text{НАД}\cdot\text{H}_2\text{-оксиредуктаза}} \text{LH}_2 + \text{НАД}$ $2) \text{LH}_2 + \text{O}_2 \xrightarrow{\text{E}} \text{свет}$	530
Насекомые (<i>Photinus pyralis</i> и др.)	Аденинуклеотидная	$\text{LH}_2 + \text{АТФ} + \text{O}_2 \xrightarrow{\text{Mg}^{++}} \text{E} \rightarrow \text{свет}$	562
Пеннатулиды (<i>Renilla reniformis</i>)	То же	$\text{LH}_2 + \text{АДФ} + \text{O}_2 \xrightarrow{\text{E}} \text{свет}$	Синяя область 460
Ракообразные (<i>Cypridina hilgendorffii</i> и др.)	Ферментсубстратная		470
Пиридиней (<i>Gonyaulax polyhedra</i>)	То же		510
Черви (<i>Odontosyllis enopla</i>)	»	$\text{LH}_2 + \text{O}_2 \xrightarrow{\text{E}} \text{свет}$	480
Моллюски (<i>Pholas dactylus</i>)	»		460
Рыбы (<i>Parapriacanthus beryciformis</i>)	»		
Кишечнодышащие (<i>Balanoglossus bimipennis</i>)	Пероксидная	$\text{LH}_2 + \text{H}_2\text{O}_2 \xrightarrow{\text{E}} \text{свет}$	Синяя область 460 и 510
Гидромедузы (<i>Aequorea victoria</i>)	—	Белок $\xrightarrow{\text{Ca}^{++}}$ свет	

Примечание. LH₂ — восстановленный люциферин, E — люцифераза. Таблица составлена в основном по данным Мак-Элроя и Селлигера (McElroy a. Seliger, 1962b, 1962d); частично использованы данные Кормьера и Тоттера (Cormier a. Totter, 1964) и Чейза (Chase, 1964).

a. Seliger, 1961, 1962a, 1962b, 1962c; De Luca a. McElroy, 1965). В реакции участвуют люциферин (LH_2), люцифераза (E), АТФ, ионы магния и кислород. Мак-Элрой и Селиджер (McElroy a. Seliger, 1963) предложили следующий ряд реакций, который, по их мнению, обуславливает люминесценцию насекомых:

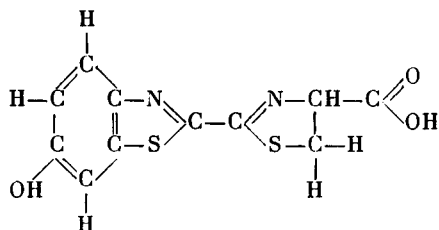


где ПФ — пирофосфат, LO — окисленный люциферин. В дальнейшем свободный пирофосфат расщепляет неактивный комплекс, после чего люцифераза и АТФ вновь используются в реакции:



Однако недавно Де Люка и Мак-Элрой (De Luca a. McElroy, 1965) нашли, что люцифераза сама может гидролизировать неактивный комплекс с отщеплением АМФ, выступая в реакции в роли гидролазы.

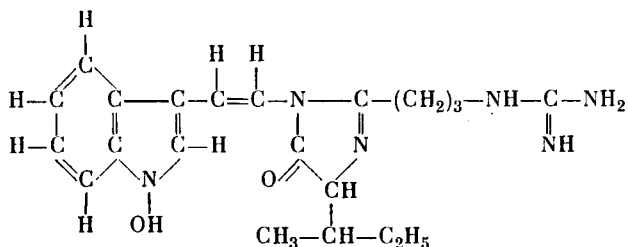
Люциферин светляков, полученный в кристаллическом виде Битлером и Мак-Элроем (Bitler a. McElroy, 1957) был затем синтезирован Уайтом и др. (White et al., 1961) путем конденсации 2-циано-6-гидроксibenзтиазола и D-цистеина. Восстановленный люциферин имеет следующую структуру:



Совсем недавно были синтезированы различные аналоги люциферина (White et al., 1965).

Для демонстрации различия в составе люциферинных разных организмов приведем структурную формулу второго (из двух расшифрованных на сегодняшний день) люциферина, полученного из ракообразного *Cypridina*¹ японскими биохимиками (Shimomura et al., 1957; Hirata et al., 1959):

¹ Люциферин и люцифераза *Cypridina* используются как удобная модель для изучения действия радиационного излучения и защитных веществ (Lohman et al., 1963, 1964). Кроме того, показано, что люциферин обладает противораковой активностью (Shinazo, 1964).



Люциферин светляка способен к самоокислению (без хемилюминесценции) и желто-зеленой флуоресценции при поглощении в области 395 мкм (McElroy a. Seliger, 1961).

Люцифераза светляков была кристаллизована в чистом виде Гринном и Мак-Элроем (Green a. McElroy, 1956). Метод получения кристаллической люциферазы из светляков в деталях описан Мак-Элроем (McElroy, 1963b).

Точная структура люциферазы светляков до сих пор не установлена. Предполагают только, что это белок, который принадлежит к эуглобулинам и, как показывает электрофорез, ультрацентрифугирование и ферментные тесты, является гомогенным после пятикратной кристаллизации (McElroy, 1963b). Люцифераза содержит семь сульфидрильных групп, причем только две SH-группы влияют каким-то образом на каталитическую активность фермента (De Luca, Wirtz a. McElroy, 1964).

Изоэлектрическая точка люциферазы лежит примерно в области pH 6.2—6.3, константа седиментации S_{25} в 0.15 M NaCl равна 5.6 ед. Сведберга. Определенный по константе седиментации молекулярный вес белка равен около $1 \cdot 10^5$ (McElroy a. Seliger, 1963).

Максимальная активность фермента наблюдается при температуре 25—27° C и pH 7.8 (McElroy, 1963b). Активность фермента сильно угнетается аминами, медью, *p*-хлормеркурбензоатом и не изменяется при воздействии мышьяка, цианистого калия и азидов (McElroy, 1963b).

При изучении биолюминесценции нескольких видов насекомых-светляков была обнаружена видовая специфичность свечения, проявляющаяся в различиях спектров испускания (Seliger a. McElroy, 1964) и в различиях латентного периода и длительности вспышки в ответ на электрический стимул (Buck a. Case, 1961). Различие в спектрах свечения у разных видов насекомых-светляков авторы указанных работ связывают с видовой специфичностью люциферазы, а именно с разной конфигурацией молекул фермента. Известно, что свечение обусловлено комплексом (E—LO—AMF); в то же время найдено, что люциферины разных видов имеют одинаковые хроматограммы, спектры поглощения и спектры испускания и, по-видимому, одинаковую структуру.

Существование видовой специфичности биолюминесценции насекомых может быть связано с биологической функцией,

суть которой состоит в распознавании по свечению особей противоположного пола своего вида.

Из всех известных хемилюминесцентных систем система светляков является самой эффективной. Селиджер и Мак-Элрой (Seliger a. McElroy, 1960) показали, что при нейтральных и щелочных значениях рН квантовый выход люминесценции светляка близок к единице.

Интенсивность свечения линейно зависит от концентрации АТФ. Этот факт послужил основой для разработки хемилюминесцентного метода определения АТФ в самых различных системах, в которые вводят дополнительно экстракт, получаемый из светляков и содержащий люциферин и люциферазу. Таким методом удается определить в некоторых случаях до 10^{-11} г/мл АТФ в растворе (McElroy a. Strehler, 1954; Cormier, 1961; Тумерман, 1962; Masterson et al., 1964; Prydz a. Froecholm, 1964; Тумерман и Федорович, 1965).

Биолюминесценция бактерий

Некоторые виды бактерий обнаруживают непрерывное свечение с максимумами, изменяющимися от вида к виду в пределах области 465—495 мкм (табл. 4.2). Свечение бактерий связано с дыханием (Harvey, 1952; McElroy a. Seliger, 1962a; Чумакова, 1963a, 1963б). Мак-Элрой и Селиджер приводят схему (рис. 4.3), которая показывает, что светоиспускающая реакция является боковой ветвью общего электронно-транспортного процесса дыхательной цепи, причем на уровне дегидрогеназ и реакций лимонно-кислого цикла реакция идет одним путем с дыханием (Чумакова, 1963б; Чумакова и Егорова, 1964a, 1964б). В последнее время предполагают (Gibson a. Hastings, 1962; McElroy a. Seliger, 1963; Чумакова, 1963б), что люминесценция бактерий возникает при катализируемом люциферазой окислении комплекса «восстановленный флавиномононуклеотид—альдегид», который рассматривают как бактериальный люциферин. При этом на экстрактах бактерий было показано (McElroy, 1961), что целый ряд высших алифатических альдегидов, содержащих от 6 до 18 атомов углерода, может участвовать в реакции, служащей источником света.

Бактериальная люцифераза только недавно была получена в кристаллическом виде (Kuwabara et al., 1964, 1965; Hastings et al., 1965). Она представляет собой белок с константой седиментации $S_{20} = 5.15$ ед. Сведберга и молекулярным весом, равным $7.6 \cdot 10^4$. Исходя из молекулярного веса, был рассчитан квантовый выход хемилюминесценции, равный примерно 0.28 на молекулу люциферазы.

В образовании одного кванта испущенного света у бактерий принимает участие 20 молекул альдегида с длинной цепочкой, около 2800 молекул НАД-Н₂ (Johnson, Sie a. Haneda, 1961) и 150 моле-

кул ФМН (Terpstra, 1962). Примерный расчет, произведенный на основании опыта с добавлением глюкозы к отмытым бактериям (Гительзон и Чумакова, 1965; Гительзон, Чумакова и Фиш, 1965), показывает, что на долю биолюминесценции приходится около $1 \cdot 10^{-6}$ часть всей энергии, выделяющейся при окислении глюкозы. При этом подсчитано, что одна бактериальная клетка излучает в среднем 100 квант/сек. На основании того, что спектральное распределение одноэлектронных шумов ФЭУ (см. раздел 5.4) соот-

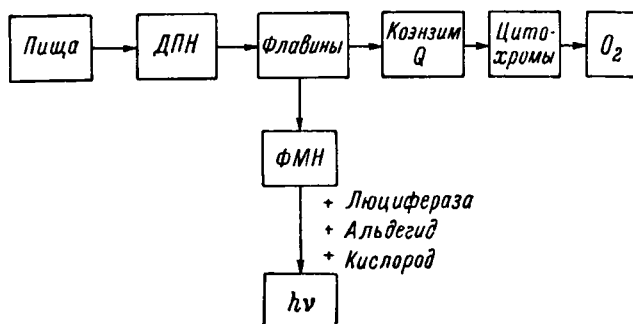


Рис. 4.3. Схема, показывающая предполагаемое место ответвления светящейся реакции от общего электронно-транспортного процесса у бактерий (McElroy a. Seliger, 1962).

ветствует спектру распределения сигнала на выходе ФЭУ от свечения бактерий, Фиш, Чумакова и Саланский (1965) предполагают одноквантовый характер свечения бактерий.

Детальное описание процессов, лежащих в основе свечения бактерий, можно найти в ряде обзоров (Reid, 1957; McElroy, 1961; Chase, 1964; Cormier a. Totter, 1964). Отметим только, что на свечение бактерий сильно влияет pH среды, концентрация солей, ингибиторов и стимуляторов (Strehler a. Cormier, 1954), концентрация кислорода (Гительзон, Фиш и Чумакова, 1965), а также такие агенты, как тепло и давление (Lippincott et al., 1964).

Связь биолюминесценции бактерий с основными реакциями обмена позволяет получать на основании изучения этой характеристики разнообразную информацию об обмене веществ в бактериальной клетке (см. обзоры: Giese, 1957; Chase, 1964). Светящиеся бактерии явились также удобной моделью для изучения действия ионизирующего излучения (Burns et al., 1962, 1965; Bruckner, 1964; Burns a. Whipple, 1964). Следует отметить работы, выполненные на темновых мутантах люминесцирующих бактерий *Photobacterium fisheri*. Роджерс и Мак-Элрой (Rogers a. McElroy, 1958a, 1958b), используя безальдегидный мутант (добавление альдегида вызывало свечение), изучили проникновение альдегида

в бактериальную клетку и показали, что нет специального механизма, ответственного за транспорт альдегида, и что липидная растворимость имеет малое значение: определяющими являются лишь величина молекулы и размер пор мембраны.

Биолюминесцентные механизмы бактерий могут быть удобной моделью для изучения некоторых процессов белкового синтеза. Для многих светящихся систем показана белковая природа фермента, катализирующего свечение, — люциферазы. Этот белок, легко обнаруживаемый по свечению, может стать таким же удобным объектом для наблюдения за его биосинтезом, как например секрет, выделяемый железой тутового шелкопряда, действие ингибиторов на синтез которого активно изучается (Смирнов и др., 1964).

В связи с этим следует обратить внимание на работы Каракашьяна и Гастингса (Karakashian a. Hastings, 1962, 1963), которые изучали действие ингибиторов макромолекулярного синтеза на ритм биолюминесценции пиридиней *Gonyaulax*. Эти организмы обладают одной из элементарных по составу систем биолюминесценции (табл. 4.2). Ингибиторы биосинтеза актиномицин D и пуромицин нарушали устойчивость ритма биолюминесценции (рис.

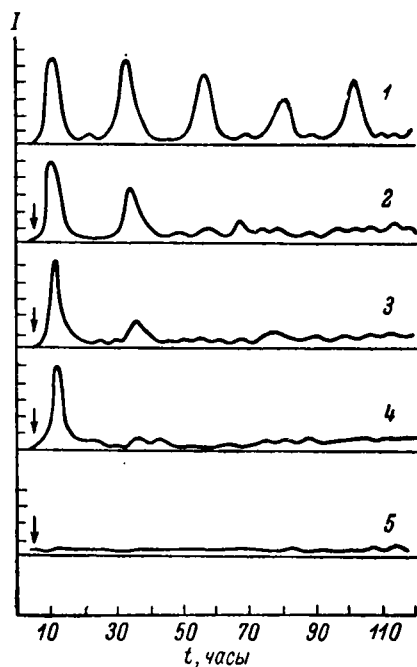


Рис. 4.4. Действие актиномицина D и пуромицина на ритм свечения *Gonyaulax* (по: Karakashian a. Hastings, 1962).

1 — контроль; 2 — актиномицин D, 0.02 мг/мл; 3 — актиномицин D, 0.04 мг/мл; 4 — актиномицин D, 0.08 мг/мл; 5 — пуромицин, 10^{-5} М. Стрелки указывают момент добавления антибиотиков.

4.4), что авторы связывают с подавлением синтеза РНК. Нам думается, что моделью для изучения синтеза белка может служить система светящихся бактерий в том случае, если бактериальная люцифераза синтезируется по общей схеме ДНК—РНК—белок. Некоторое преимущество использования бактерий состоит в том, что для них можно получать безлюциферазные мутанты (Rogers a. McElroy, 1958a, 1958b), которые растут так же хорошо, как и дикий тип. Поэтому ингибирование синтеза люциферазы, сразу же отражаясь на свечении, не должно влиять на жизнеспособность клетки.

Большое внимание исследователей обращено в последнее время на люминесценцию гидромедуз *Aequorea* и *Halistaura*, у которых для свечения требуется только белок, ионы Са или Sr и вода. В отличие от подавляющего большинства известных систем для свечения медуз совсем необязательно присутствие кислорода. Из фотогенных тканей *Aequorea* была получена выжимка, которая светилась сине-зеленым светом с максимумом при 460 мкм и небольшим «плечом» в области 500—520 мкм. Из такой выжимки впоследствии выделили два вещества, участвующие в свечении (Johnson et al., 1962; Shimomura et al., 1962a, 1962b, 1963a, 1963b). Первое вещество оказалось белком, названным авторами экворином. Этот белок характеризуется молекулярным весом $3.5 \cdot 10^3$, константой седиментации, равной 2.1 ± 0.5 ед. Сведберга, изоэлектрической точкой при $pH < 5.5$, спектром поглощения с максимумом при 280 и «плечом» при 310 мкм. При добавлении к раствору экворина ионов Са наблюдается свечение с максимумом при 465 мкм. Второе вещество авторы назвали «зеленым белком»; свойства его еще не исследованы. Этот белок при возбуждении в области 270 мкм флуоресцирует с двумя пиками, при 350 и 510 мкм, а при возбуждении в области 390 или 460 мкм обнаруживает максимум при 515 мкм.

Такое перекрывание спектра испускания экворина и спектра поглощения зеленого белка (рис. 4.5) обеспечивает возможность миграции энергии возбуждения с одного белка на другой (или тривиальной реабсорбции света).

Белок, подобный по физико-химическим свойствам экворину, был выделен из фотогенных тканей медузы *Halistaura* и назван по аналогии с экворином галистаурином (Shimomura et al., 1963b). По спектру поглощения этих белков, имеющему максимумы при

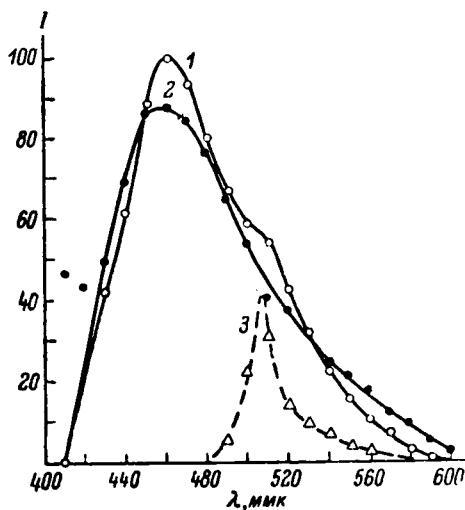


Рис. 4. 5. Спектры флуоресценции выжимки, экворина и «зеленого белка» из медузы *Aequorea* (Johnson et al., 1962).

1 — выжимка из фотогенной ткани после выдерживания в течение нескольких дней в насыщенном растворе сульфата аммония, 2 — очищенный раствор экворина, экстрагированный из фотогенной ткани, 3 — «зеленый белок» ($\lambda_{возб} = 390$ или 460 мкм), экстрагированный из фотогенной ткани.

280 и 310 мкм, можно судить о том, что в экворине и галистаурине наряду с белковой частью имеется небелковый компонент, который и был обнаружен в продуктах реакции по спектральным характеристикам. Этот компонент имеет характеристики поглощения и флуоресценции, близкие к восстановленному никотинамиддинуклеотиду (НАД-Н₂). Авторы предполагают, что источником испускания света служит этот пиридиновый компонент.

Таким образом, общая схема светоиспускающей реакции сводится к тому, что под действием Са⁺⁺ (или в результате присоединения Са⁺⁺) возникает возбужденный экворин, пиридиновый компонент которого испускает свет. Часть энергии возбуждения мигрирует на зеленый белок (или происходит реабсорбция света), в результате чего возникает сине-зеленое свечение медузы. Физический механизм возбуждения экворина или образования его возбужденного комплекса с Са⁺⁺ пока не выяснен.

С помощью белка экворина, выделенного из медузы *Aequorea*, как отмечают Шимомура и др. (Shimomura et al., 1963c), можно быстро и довольно просто определять малое содержание ионов Са и Sr в биологических системах.

Биологическая роль биолюминесценции

Свечение у некоторых многоклеточных организмов выполняет функцию привлечения особой противоположного пола, заманивания жертвы (Harvey, 1952; Reid, 1957), маскировки от врага (Clarke, 1963), что могло способствовать выживанию видов в процессе эволюции. Такая точка зрения развивается давно: ее можно найти у Сизова (1917), Гринберга (1920), Шимкевича (1923) и, возможно, в еще более ранних работах. Бак (Buck, 1961) предположил, что на ранних стадиях эволюции существовала связь между зрительными и биолюминесцентными органами. У большинства светящихся одноклеточных люминесценция, по-видимому, не имеет какого-либо адаптивного значения и ее часто считают побочным явлением, сопровождающим процессы обмена веществ. Однако, по мнению Чумаковой (1963б), у бактерий является формой защиты клеточных структур от неупотребленной по какой-либо причине энергии. Действительно, если биолюминесценция бактерий бесполезна, то неизвестно, что задерживает в природе замену светящихся бактерий их темновыми мутантами.

Тот факт, что химическая основа биолюминесценции у различных организмов различна, согласуется с фактом отсутствия закономерности в распределении светящихся видов по крупным таксономическим категориям. Мак-Элрой и Селиджер (McElroy a. Seliger, 1962b, 1962d) предположили, что на пути эволюции от анаэробной к аэробной форме жизни кислород являлся токсичным для анаэробов. Некоторые из них выработали способность эф-

фективно «уничтожать» попадающий в них молекулярный кислород, расходуя его на окисление люциферина. Таким образом, биолюминесценция, по их мнению, представляет собой рудиментарное явление, имевшее приспособительное значение на ранних этапах эволюции. Эта точка зрения была подвергнута критике в работах Журавлева (1965а, 1965б). Согласно оригинальной гипотезе этого автора, биолюминесценция возникла как первичный внутренний поставщик энергии для нужд организма. С развитием цепи окислительно-восстановительных ферментов потребность в таком источнике отпала и биолюминесценция стала выполнять функцию защиты против спонтанного автоокисления биосубстратов в тканях высших организмов. Кроме того, в процессе эволюции некоторые организмы стали использовать биолюминесценцию для целей информации или дезинформации.

Пока нет оснований считать ни одну из рассмотренных точек зрения о роли биолюминесценции окончательной. Молекулярные механизмы ее сравнительно недавно подвергаются пристальному изучению. Возможно, что именно на пути расшифровки этих механизмов будут получены сведения о биологической роли биолюминесценции у тех объектов, у которых в настоящее время биолюминесценция рассматривается как явление, лишенное приспособительного значения.

4.3. НАВЕДЕННАЯ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ

В некоторых случаях хемилюминесценция живых объектов и биологически важных веществ возникает в результате воздействия на них света, излучения радиоактивных источников или рентгеновского и, наконец, тепла. Образовавшиеся в результате этого воздействия продукты вступают в различные химические реакции между собой, с исходным веществом и с кислородом воздуха. Часть этих реакций сопровождается свечением, изучение которого важно, так как оно позволяет анализировать процессы взаимодействия индуцирующего излучения с веществом. Тем не менее мы не будем рассматривать сколь-нибудь глубоко природу этой хемилюминесценции, так как освещение этих вопросов потребовало бы предварительного изложения довольно обширных сведений из различных областей фотохимии, радиационной химии, термохимии, в которых авторы не являются специалистами. Поэтому мы ограничимся в основном феноменологическим описанием и ссылками на литературу.

Фотохемилюминесценция

Фотоактивные объекты. Стреллер и Арнольд (Strehler, 1951; Strehler a. Arnold, 1951) описали длительное послесвечение фотосинтезирующих организмов и суспензий хлоро-

пластов. Природе этого явления посвящено сравнительно большое число работ, часть которых проанализирована в статьях Браггера и Франка (Brugger a. Franck, 1958), Литвина и др. (1960). Индуцированное свечение хлорофилла, его аналогов и клеток, содержащих хлорофилл, связывают с окислением фотовосстановленных пигментов кислородом и с окислением пигментов перекисями (Красновский, 1963; Владимиров и Литвин, 1965).

Нефоточувствительные объекты. Владимиров и Литвин (1959) обнаружили послесвечение сухих белков, облученных ультрафиолетовым светом при комнатной температуре. В дальнейшем это свечение подробно изучили Конев и Катибников (1961), Катибников и Конев (1962), которые обнаружили в свечении два компонента с большим (часы) и малым (секунды) временами жизни. Они высказали предположение, что свечение связано с консервацией возбужденных электронов надмолекулярным уровнем организации белка и последующим высвечиванием с триплетного уровня триптофана. Анализ данных, полученных Коневым и Катибниковым, привел к предположению, что это свечение тоже является результатом определенных фотохимических реакций (Баренбойм, 1963).

Действительно, Сапежинский и соавторы в серии работ (Сапежинский, Силаев и Донцова, 1964, 1965; Сапежинский и Силаев, 1965а, 1965б; Сапежинский и Эмануэль, 1965) показали, что долго живущий компонент этого свечения имеет хемилюминесцентную природу и связан либо с взаимодействием перекисных соединений с реакционноспособными группами белка (Сапежинский и Эмануэль, 1965), либо с рекомбинацией перекисных радикалов, образованных под действием излучения (Сапежинский, Силаев и Донцова, 1965). Второму предположению авторы, по-видимому, отдают предпочтение. Вопрос о природе этих радикалов, о конкретном механизме их взаимодействия остается пока открытым.

Нефоточувствительные живые объекты иногда также способны к фоточувствительной хемилюминесценции. Владимиров и др. (1962) наблюдали фотоиндуцированную хемилюминесценцию дрожжей с максимумами свечения при 460 и 510 мкм. Фиш, Саланский и Чумакова (1965) отметили усиление сверхслабого свечения поверхности печени живых крыс после облучения ультрафиолетовым светом. Детально механизм индуцированного свечения нефоточувствительных клеток не изучался.

Хемилюминесценция под действием ионизирующего излучения

Существование радикального механизма фотохемилюминесценции белков дает основание предполагать, что при рентгеновском и гамма-облучении, которые приводят к большему по сравне-

нию с УФ излучением энергетическому выходу радикалов, можно будет наблюдать еще более интенсивную хемилюминесценцию. Работы, в которых такое свечение действительно было обнаружено, уже рассматривались на стр. 102 и мы ограничимся очень сжатым повторением.

Облучение рентгеновской радиацией ДНК в растворе приводит к ее последующей хемилюминесценции, которую связывают с образованием гидроперекисей тимина (Жижина и др., 1965; Эмануэль и др., 1965).

Сапежинский с соавторами (Сапежинский, Силаев и Эмануэль, 1963, 1964, 1965; Сапежинский, Силаев и Донцова, 1964) показали, что рекомбинация перекисных радикалов белка, возникающих в результате воздействия ионизирующей радиации, приводит к хемилюминесценции растворов различных белков. В сухих облученных белках рекомбинация перекисных радикалов происходит при их растворении и также сопровождается свечением (Сапежинский, Силаев и Эмануэль, 1963). Аналогичное явление наблюдалось при погружении в воду предварительно подвергшихся рентгеновскому облучению высушенных клеток (Брумберг и Барский, 1960). В этом случае свечение может быть обусловлено не только рекомбинацией перекисных радикалов белков клетки, но и взаимодействием радикальных продуктов, образовавшихся из других клеточных веществ. В частности, свечение при растворении было обнаружено у предварительно облученных веществ — сахара, крахмала и глюкозы (Westermarck a. Grapendieser, 1960).

Хемилюминесценция под действием нагрева

Нагревание различных веществ может приводить к образованию продуктов термического распада, реакции которых между собой и с кислородом сопровождаются свечением. Условно назовем этот процесс термохимическим свечением.

Нагревание может также способствовать взаимодействию продуктов, образованных при воздействии света или рентгеновского (гамма-, альфа-, бета- и т. д.) излучения на основное вещество, особенно в том случае, если это взаимодействие было заторможено глубоким охлаждением объекта. Этот процесс в дальнейшем будем называть индуцированным термовысвечиванием.

Термохимическое свечение. Мочалкин (1965) обнаружил, что нагревание почти всех исследованных порошкообразных аминокислот (аланин, аспарагин, валин, лейцин, триптофан, тирозин и т. д.) приводит к возникновению свечения в области 380—540 мкм. Свечение возникает при температурах около 120—150° С и выше, но только в присутствии воздуха или кислорода; в то же время в атмосфере гелия или аргона свечение не наблюдалось.

Предположив, что ответственной за свечение является реакция окисления, автор определил энергию активации ΔE этой реакции для различных аминокислот. Близкие значения ΔE для различных аминокислот (0.65—0.70 эв) говорят об общности механизмов окислительного разложения, хотя существуют экспериментально обнаруженные исключения: например, для β -фенил- α -аланина характерно существование двух активационных барьеров, соответствующих двум максимумам свечения.

Конкретные механизмы этого свечения пока не ясны. Значения ΔE скорее всего относятся к совокупности различных реакций; возможно, что такое усреднение и приводит к близким значениям ΔE для различных аминокислот. Вряд ли также есть основания считать, как это делает автор, что определенные экспериментально значения энергии активации близки к соответствующим значениям при окислительных процессах в живой ткани: нет нужды доказывать, что окислительные процессы при термической деструкции биологически важных веществ и их окисление в организме могут идти совершенно различными путями.

И н д у ц и р о в а н н о е т е р м о в ы с в е ч и в а н и е. Это явление по механизму реакций, приводящих к свечению, можно разделить на, термолюминесценцию и термохемилюминесценцию.

Термолюминесценция, в ее классическом виде — это свечение, возникающее при выходе электронов из ловушек вследствие нагревания (после предварительного заполнения ловушек при низкой температуре) и последующей рекомбинации их с положительно заряженными центрами. Предварительно заполнить ловушки можно, облучая вещество светом или ионизирующей радиацией при температуре столь низкой, что ловушки не опустошаются. При повышении температуры со скоростью β возникает свечение, достигающее максимума при температуре T^* . По величинам β , T^* , полуширине пика высвечивания δ и некоторым другим характеристикам можно определить энергетическую глубину ловушек E , распределение числа ловушек по энергии $N(E)$ и распределение электронов по ловушкам $n(E)$. Этот метод исследования был предложен Урбахом в 1930 г. (Urbach, 1930) и разрабатывался затем многими исследователями. Фундаментальный обзор теоретических работ выполнен Лушиком (1955).

Таким образом, термолюминесценция — это физическое явление, имеющее вполне определенную природу, и она не связана с химической деструкцией молекулы. Не каждый случай свечения, возникающего при нагревании предварительно облученных объектов, следует называть термолюминесценцией, как это часто делается. Термолюминесценцию следует отличать от термохемилюминесценции — свечения, возникающего в ходе активируемых теплом химических реакций между продуктами фотоллиза или радиоллиза (возможно, с участием кислорода).

Так, например, Арнольд и Шервуд (Arnold a. Sherwood, 1957) обнаружили свечение, возникающее при нагревании предварительно освещенных пленок хлоропластов, выделенных из различных растений, которое они связали с чисто физическим процессом запасаения энергии в полупроводниковых электронных ловушках. Это явление было затем подвергнуто изучению в работах Литвина с соавторами (1960) и Тумермана с сотрудниками (1962), которые показали, что эффект термовысвечивания можно объяснить образованием в процессе освещения перекисного продукта, разлагающегося при нагревании, т. е. свечение является термохемилюминесценцией.

По-видимому, термолюминесценция — это вообще явление иного рода, нежели хемилюминесценция, однако во многих случаях практическое решение вопроса о природе индуцированного термовысвечивания (термолюминесценция или термохемилюминесценция?) весьма затруднительно. Поэтому нам представляется полезным в этом разделе привести данные как тех работ, в которых, по мнению авторов, наблюдается термолюминесценция, так и тех работ, где рассматривается термохемилюминесценция.

К настоящему времени исследовано индуцированное термовысвечивание глубоко охлажденных (77°K), кристаллических порошков аминокислот и белков, предварительно облученных УФ светом (Gill, 1963; Gill a. Weissbluth, 1964; Кузнецов и Кукушкин, 1965), гамма-лучами (Augenstein et al., 1960, 1961; Weinberg et al., 1962), рентгеновским излучением (Prydz a. Røgeberg, 1964) и замороженных растворов тех же соединений, облученных УФ светом (Рощупкин и Владимиров, 1964, 1965а, 1965б; Владимиров, Аксенцев и Оленев, 1965).

Термовысвечивание замороженных растворов или сухих порошков ароматических аминокислот легко обнаружить: интенсивность свечения размораживаемого раствора триптофана, предварительно облученного УФ светом, достаточно высока. На рис. 4.6 в качестве примера показано термовысвечивание кристаллического порошка триптофана (по неопубликованным данным работы авторов совместно с В. Ф. Соломатиным).

Впервые индуцированное термовысвечивание биологически важных веществ было исследовано в серии работ Оженстина и его сотрудников (Augenstein et al., 1960, 1961; Weinberg et al., 1962; Carter et al., 1963), посвященных термовысвечиванию порошкообразных кристаллических аминокислот и высушенных белков, облученных при температуре жидкого азота гамма-излучением Co^{60} . Появление этого свечения они объясняют возникновением ловушек при облучении, т. е. определяют это свечение как термолюминесценцию.

Появление ловушек, определяющих термолюминесценцию, по предположению авторов цитируемых работ, обусловлено тем, что анизотропия распределения зарядов в белке приводит к возник-

новению многочисленных потенциальных ям, способных захватить и дырки. В кристаллическом белке число ловушек увеличивается за счет дефектов решетки. Существование ловушек полупроводникового типа в сухих белках предполагается и в ряде других работ (см. обзор: Eley, 1962). С другой стороны, существование полупроводниковых свойств белка подвергается критике (Волькенштейн, 1964). Не исключено, что термовысвечивание, или часть его, связано с рекомбинацией радикалов, возникших при облучении сухого охлажденного белка. В связи с этим интересно, что энергия активации свечения трипсина составляет 2 ккал/моль

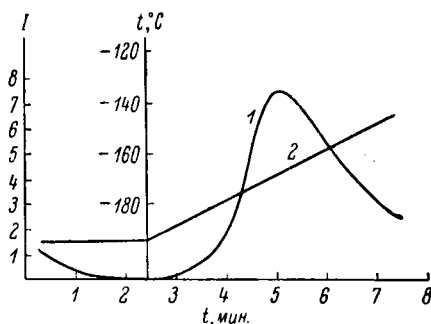


Рис. 4.6. Термовысвечивание триптофана.

1 — интенсивность термолюминесценции (I), 2 — температура (t °C). t — время после облучения.

(Augenstein et al., 1961), а энергия активации радикальной реакции хемилюминесценции предварительно облученного сывороточного альбумина — 2—10 ккал/моль (Сапежинский, Силаев и Донцова, 1965).

В рассматриваемых работах Ожестина и соавторов было установлено, что термовысвечивание определяется не столько структурой кристаллической решетки, сколько химическим строением молекул. Этот вывод следует из значительных различий в интенсивности и положении температурных макси-

мумов кривых термовысвечивания для кристаллов ряда аминокислот, имеющих одинаковую кристаллическую структуру.

Оказалось также, что термовысвечивание белков не является простой суммой термолюминесценций независимых аминокислот, составляющих эти белки, что доказывает влияние структуры белка на термолюминесценцию аминокислотных остатков. По-видимому, этот вывод пока следует распространить только на первичную структуру: уже одно включение аминокислот в полипептидную цепь может резко изменить термолюминесцентные свойства аминокислот за счет образования α -амино и карбоксильными группами пептидной связи. Поэтому было бы очень интересно исследовать термолюминесценцию простых дипептидов.

Гилл в 1962 г. (цит. по: Gill a. Weissbluth, 1964) обнаружил термовысвечивание после предварительного облучения УФ светом глубоко охлажденных кристаллических образцов аминокислот, а также белков (Gill, 1963; Gill a. Weissbluth, 1964). По мнению автора, обнаруженное явление — термолюминесценция. Природа метастабильного уровня (ловушки), ответственного за запасание энергии, неизвестна, но предполагается, что возможным механизмом образования этого метастабильного уровня яв-

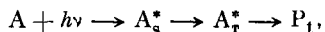
ляется захват электрона NH_3^+ -группой молекулы (возбужденной или соседней с ней) или ионами металлов (Fe^{+++} , Cu^{++} и т. п.), которые всегда присутствуют в образцах аминокислот.

Предполагается также, что свечение происходит при переходе с триплетного уровня на основной (максимум в области 400—450 мкм — Gill, 1963), чему предшествует активационный переход с метастабильного уровня (ловушки) на триплетный. Энергия активации для тирозина, например, оказалась равной 0.16 эв. Процесс высвечивания активируется также видимым светом: после дополнительного облучения видимым светом интенсивность термолюминесценции падает в 20 раз. Авторы указывают, что процесс термовысвечивания белков не отвечает мономолекулярному механизму, справедливому для аминокислот.

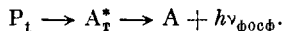
Если принять гипотезу о возможном образовании метастабильного уровня за счет связывания электрона группой NH_3^+ , то понятно, что уже включение аминокислот в полипептидную цепь должно привести к различиям в термолюминесценции свободных аминокислот и белков.

Термовысвечивание замороженных растворов аминокислот и белков, облученных УФ светом, подробно изучено в работах Рощупкина и Владимирова (1964, 1965а, 1965б), Владимирова и др. (1965) (см. также обзор: Владимиров, 1965). Максимум кривой термовысвечивания всех исследованных соединений наблюдался при 81—84° К.¹ Сопоставление кривых термовысвечивания и медленно затухающего свечения, впервые описанного Дебаем и Эдвардсом (Debay a. Edwards, 1952), привело авторов к выводу, что оба процесса, спектрально близкие к флуоресценции, имеют общую природу и связаны с расходом одного и того же нестойкого первичного фотопродукта (P_1).

Авторы рассматриваемых работ считают, что продукт, ответственный за термовысвечивание, возникает после предварительного перехода молекулы А в триплетное возбужденное состояние (A_t^*)



а термовысвечивание связано с обратной фотохимической реакцией



Эти механизмы подробно обсуждаются в обзоре Владимирова и Литвина (1965) и Владимирова (1965).

¹ От этих данных отличаются результаты, полученные ранее (Gill, 1963), согласно которым максимум термовысвечивания тирозина, например, наступает при 124° К, а кривые термовысвечивания фенилаланина имеют два пика при 113 и 155° К, которые связаны с существованием двух метастабильных уровней (ловушек) разной энергии. Эти различия можно связать как с разным исходным состоянием веществ, использованных в этих работах, так и с тем, что различная скорость нагрева может резко влиять на положение максимума и его разрешение на соответствующих кривых (Луцкий, 1955).

Так же как это отмечалось ранее (Gill a. Weissbluth, 1964) для порошков, термовысвечивание замороженных растворов резко падает при дополнительном облучении светом в видимой области замороженного и уже подвергшегося действию УФ света образца. Рошупкин и Владимиров (1965б) связывают это явление с высокой светочувствительностью фотопродукта P_1 , в то время как по Гиллу (Gill, 1963) это связано с опустошением ловушек.

Дузу и др. (Douzou et al., 1961) пытались, но не смогли обнаружить термолюминесценцию ДНК при УФ облучении.

Подводя итог рассмотренным исследованиям по индуцированной термолюминесценции, легко заметить, что во многих из названных работ внешняя картина явления (спектральный состав свечения, зависимость термовысвечивания от температуры, от присутствия посторонних газов, от добавочного облучения видимым светом, величина энергии активации, различия между термовысвечиванием свободных аминокислот и белков) очень близка. Наблюдаемые же различия между этими характеристиками можно попытаться связать с различиями в исходном состоянии исследуемых веществ (кристаллические или сухие вещества, замороженные растворы), с различиями в действии излучения, используемого для индуцирования термолюминесценции (УФ, рентгеновское, гамма-), и, наконец, с различными условиями эксперимента (продолжительность облучения, скорость нагрева и т. д.).* Тем не менее для объяснения природы явления в одних работах используются понятия термолюминесценции полупроводников, в других — термохемилюминесценции, связанной с радикальными механизмами.

Действительно ли такие факторы, как состояние вещества и вид индуцирующего излучения, определяют принципиально различные механизмы или эти факторы лишь незначительно меняют феноменологическую сторону явления? Можно ли считать, что имеют место оба механизма, с преобладанием одного из них в зависимости от этих факторов?

Ответ на эти вопросы может дать работа, в которой индуцированное термовысвечивание будет исследоваться при варьировании названных факторов и прочих равных условиях эксперимента.

* То, что характеристики термовысвечивания существенно зависят от вида и энергии ионизирующей радиации, используемой для облучения, следует из работы Пруца и Рогенберга (Prydz a. Rogeberg, 1964), которые определили спектры термолюминесценции порошков тирозина и триптофана, возникшей после облучения рентгеновскими лучами. Такие спектры резко отличаются от обычных спектров флуоресценции и фосфоресценции этих аминокислот (см. раздел 1.1), а также от спектров термовысвечивания, возникающего при гамма-облучении. Для триптофана максимумы спектров наблюдались при 575 и 630 мкм, для тирозина — при 490 мкм.

ОСОБЕННОСТИ ЭЛЕМЕНТОВ АППАРАТУРЫ ДЛЯ РЕГИСТРАЦИИ ЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ

Принцип работы установок для измерения характеристик люминесценции обычно состоит в следующем: свет источника раскладывается в спектр монохроматором или системой светофильтров и, попадая на исследуемый объект, вызывает его свечение. Свет люминесценции выделяется системой светофильтров или раскладывается в спектр монохроматором, попадает на приемник излучения и затем на регистрирующее устройство.

Основные элементы, из которых собирают подобные установки, изготавливаются промышленностью. Задача экспериментатора состоит прежде всего в том, чтобы правильно выбрать соответствующий элемент и максимально использовать его технические возможности. В наибольшей степени сказанное относится к приемнику излучения и регистрирующему устройству, поскольку совершенствование этих элементов может быть основным путем увеличения чувствительности всей установки в целом.

В самом деле, методы разложения света в спектр мало изменились со времен Вуда, лампы, дающие поток УФ света, известны достаточно давно, однако только использование в качестве приемника излучения фотоэлектронного умножителя (ФЭУ) позволило изучить УФ флуоресценцию белков и нуклеиновых кислот. Темновая хемилюминесценция была обнаружена тоже благодаря применению ФЭУ, а точнее — благодаря разработке методов, резко увеличивающих порог чувствительности ФЭУ.

Предлагаемая читателю глава содержит краткое описание тех основных элементов, которые могут быть использованы в установках для регистрации параметров люминесценции биополимеров и клеток. В частности, особое внимание уделено применению ФЭУ для регистрации слабых световых потоков.

5.1. ВЫБОР ЭЛЕМЕНТОВ АППАРАТУРЫ

Регистрация параметров люминесценции биополимеров и клеток имеет ряд особенностей, связанных со спецификой исследуемого объекта. Эти особенности определяют конструкцию устано-

вок (см. гл. 6), и, естественно, в первую очередь эти особенности учитывают при выборе отдельных элементов установки. Рассмотрим основные из этих элементов: источники света, монохроматоры, светофильтры и ФЭУ, которые используются для целей люминесцентного анализа биополимеров и клеток.

Источники света

Источники света, обычно используемые для возбуждения УФ-люминесценции биологических объектов, характеризуются параметрами, приведенными в табл. 5.1.

Таблица 5.1

ХАРАКТЕРИСТИКИ ЛАМП, УПОТРЕБЛЯЕМЫХ В ЛЮМИНЕСЦЕНТНОМ АНАЛИЗЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ

Тип лампы	Характер спектра в УФ области	Световой поток (лм)	Яркость в центре разряда, наименьшая (Мнт)	Расстояние между электродами (мм)	Режим работы		
					напряжение питания, наименьшее (в)	напряжение на лампе, наибольшее (в)	рабочий ток через лампу, наибольший (а)
ГСВД-120	Сплошной	—	40	3.0—3.5	150	25	5.0
ДКСШ-200	»	—	70	2.0—2.5	70	22	12.0
ДКСШ-1000	»	28000	200	2.7—4.1	70	20	50.0
ДРШ-100	Линейчатый	1200	700	0.5	127	26	4.0
СВД-120А		4200	—	30	220	140	1.7
ДРШ-250		12500	100	3.9	127	72	4.0
ДРШ-500		22500	130	4.6	220	75	7.5
ДРШ-1000		53000	120	8	220	90	12.0

Примечание. Число в обозначении типов лампы указывает ее мощность в вт; первые три лампы работают только на постоянном токе, остальные — на постоянном и переменном; характеристика ламп приведена по данным Московского электролампового завода.

Указанные в табл. 5.1 лампы относятся к категории газосветных, дугового разряда. Физические основы работы, спектральные характеристики и схемы включения этих и других источников света подробно описаны в литературе (Голланд, 1961; Константинова-Шлезингер, 1961; Шишловский, 1961; Владимиров и Литвин, 1964). Сравнение яркостей ряда ламп (СВД-120А, ДРШ-100, ДРШ-250 и др.) в области 248—436 мкм с лампой ПРК-4 проведено Агроскиным (1957).

Из перечисленных ламп следует отметить СВД-120А. Простота в обращении, возможность работы на переменном или постоянном токе, зажигание без специального внешнего устройства, интенсивное излучение в области 240—280 мкм и, наконец, возможность применения серийно выпускаемого осветителя ОИ-18

определяют широкое распространение этой лампы в аппаратуре для люминесцентного анализа биологических объектов. При регистрации спектров возбуждения, когда источник света должен иметь в области поглощения исследуемого объекта сплошной спектр, хорошо, по нашим данным, зарекомендовала себя лампа ДКсШ-200.

Для газосветных ламп дугового разряда характерна нестабильность светового потока, которая связана с нестабильностью напряжения источника питания, перемещением (в том числе и вращением) светового шнура и изменением со временем пропуска-

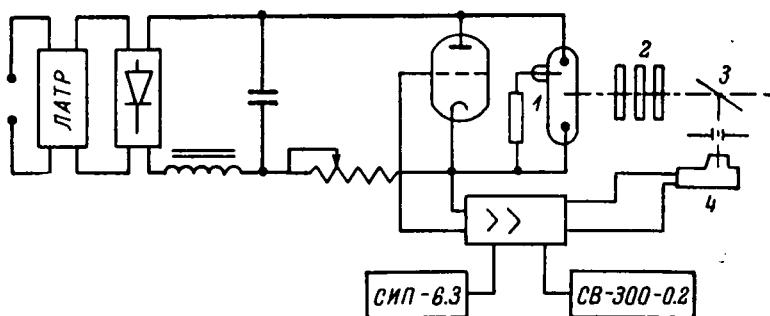


Рис. 5.1. Блок-схема стабилизатора лампы.

Объяснения в тексте.

ния баллона лампы («выгоранием»). Стабилизация напряжения питания этих ламп не устраняет остальные причины нестабильности, и поэтому для получения стабильного светового потока применяют схемы, непосредственно реагирующие на поток излучения. Такие стабилизаторы описаны Широковым (1956) и Русиновым (1962) для лампы ДРШ-250, Баренбоймом и др. (1962) для лампы СВД-120А. Принцип работы стабилизатора был предложен Чансом (Chance, 1940) и сводится к регистрации изменения светового потока лампы фотоэлементом или фотоумножителем, усилению полученного сигнала и управлению им лампами, шунтирующими источник света. На рис. 5.1 показана блок-схема такого стабилизатора, применяемая нами. После лампы 1 и системы светофильтров 2 помещена кварцевая пластинка 3, отражающая часть света (приблизительно 4%) на фотоэлемент 4 типа Ф-4. Сигнал с фотоэлемента усиливается двухкаскадным усилителем постоянного тока и подается на управляющую сетку лампы 6Н5С (рис. 5.2). Лампа 6Н5С шунтирует лампу СВД-120, поэтому анодное питание их осуществляется от одного выпрямителя. Применение этой схемы позволяет стабилизировать световой поток в узкой спектральной области с точностью $\pm 0.5\%$ при колебаниях напряжения источника питания лампы ± 30 в. К недостаткам

данного метода следует отнести то, что он плохо реагирует на быстрые перемещения светового шнура лампы.

Косвенным методом стабилизации светового потока является деление (электронное или электромеханическое) полезного сигнала на опорный, зависящий только от интенсивности горения лампы (Мекшенков и Андрейцев, 1960), или автоматическое регулирование опорным сигналом коэффициента усиления усилителя полезного сигнала (Eisenberg et al., 1962).

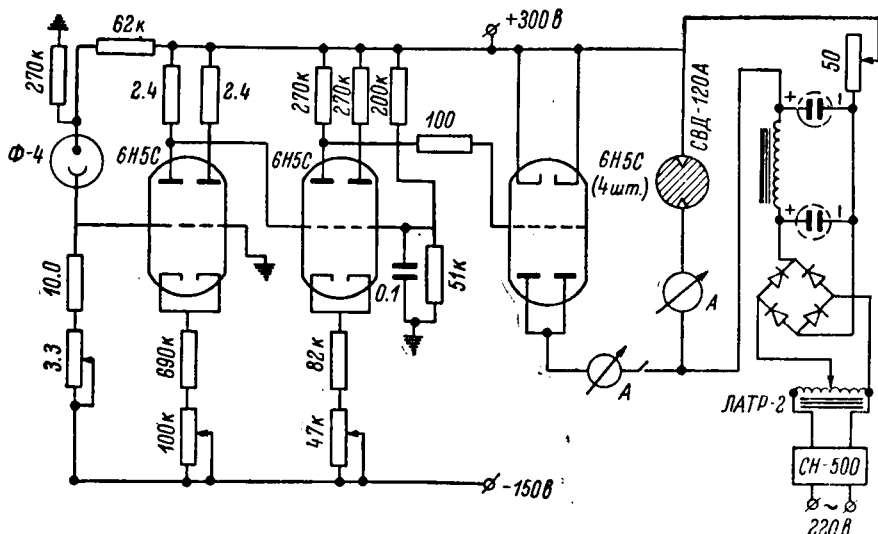


Рис. 5.2. Электрическая схема стабилизатора.

Кроме газосветных ламп дугового разряда, при регистрации люминесцентных характеристик объектов, подверженных быстрой фотохимической деструкции, при регистрации фосфоресценции с разовым возбуждением и т. д. хорошо зарекомендовали себя импульсные источники света. Барский и Якубенас (1964) использовали импульсную лампу ИСП-500 в установке для импульсного микрофотографирования биологических объектов. Нами для возбуждения фосфоресценции использовалась лампа ИСК-25. В импульсном режиме удачным также оказалось использование ламп сверхвысокого давления ДРШ-250 и ДРШ-500. В этом случае при подаче высоковольтного импульса на поджигающий электрод через лампу разряжается емкость 2000 мкф, заряженная до потенциала 200 в. Результаты показывают, что эти лампы, работающие в импульсном режиме, имеют преимущества перед обычно применяемой для подобных целей лампой ИСК-25, а именно, свет их удобнее фокусировать на объект, и спектральный состав света лучше соответствует условиям возбуждения люминесценции биополимеров, так как в нем преобладает ультрафиолетовый компо-

нент, а красный компонент спектра в отличие от лампы ИСК-25 мал. К сожалению, увеличение мощности вспышки за счет напряжения питания затруднено тем, что напряжение самопробоя у этих ламп, по нашим данным, сравнительно низкое: у ДРШ-250 оно колеблется от 200 до 300 в, у ДРШ-500 — несколько выше.

Ассортимент отечественных импульсных ламп представлен в обзоре Маршака (1962) и в его книге (1963).

Монохроматоры

Для возбуждения люминесценции биополимеров и клеток рекомендуется применять двойные монохроматоры, так как такие монохроматоры позволяют достаточно хорошо избавиться от сопутствующего рассеянного света в спектре, который может маскировать и без того слабое свечение объекта. В качестве такого монохроматора можно использовать монохроматор ДМР-4, хотя лучше зарекомендовал себя ранее выпускаемый ДМР-2.

Для разложения в спектр свечений, особенно слабых, применяют светосильные монохроматоры, в которых, однако, стараются иметь минимум рассеянного и поглощенного света внутри прибора. Из промышленных монохроматоров, пригодных для таких целей, следует отметить монохроматор ЗМР-3 и монохроматоры спектрофотометра СФД-2 и СФ-4. Монохроматоры этого типа также с успехом могут быть использованы и для возбуждения люминесценции (Катибников и Конев, 1961; Бурштейн и Владимиров, 1964).

Из несерийных монохроматоров несомненный интерес представляет прибор, разработанный Васильевым и др. (1963), который выполнен по схеме Фасти на реплике дифракционной решетки (150×140 мм, 600 штрихов/мм), имеет светосилу 1 : 1.5, высоту щелей 70 мм и предназначен для спектрального анализа сверхслабых свечений.

Монохроматор МДР-2, по оптической схеме подобный описанному выше, разработан на Ленинградском объединении оптико-механических предприятий, и его серийный выпуск, по сообщению Александрова и др. (1965), намечен на 1966 г. Технические данные некоторых промышленных монохроматоров, которые могут быть использованы при работе в УФ области спектра, представлены в табл. 5.2.

Конструкциям монохроматоров посвящены некоторые разделы монографии Шишловского (1961), призменные монохроматоры описаны в монографии Топорца (1955). Сведения о некоторых образцах промышленных зарубежных монохроматоров, используемых в люминесцентном анализе биологических объектов, даны в книге Юденфренда (Udenfriend, 1962). Монохроматоры для микроспектральных исследований разработаны Агроскиным и Королевым (1963).

Таблица 5.2
НЕКОТОРЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ОТЕЧЕСТВЕННЫХ МОНОХРОМАТОРОВ, РАБОТАЮЩИХ В УФ ОБЛАСТИ СПЕКТРА

Тип монохроматора	Рабочая область (ммк)	Относите- льное отвер- стие	Фокусное расстояние входного коллиматора (мм)	Диспергирующий элемент	Дисперсия D_l при длине волны λ	
					D_l (Å/мм)	λ (ммк)
ДМР-4	210—2500	1:9.4	343	Две призмы с преломляю- щим углом 30°	9.9	219
ДМР-2	220—2700	1:7	270	Две призмы с преломляю- щим углом 56°	6	220
ЗМР-3	220—2500	1:7	270	Одна призма с преломляю- щим углом 56°	29	271
Монохроматор спектро- фотометра СФ-4 . . .	210—1100	1:10	500	Одна призма с преломляю- щим углом 30°	7.5 100	200 400
Монохроматор спектро- фотометра СФД-2 . . .	210 ÷ 1100	1:10	500	Плоская реплика (600 штрих./мм)	32	Во всем рабочем диапазоне
МДР-2	200—2500	1:2.4	400	Три сменные плоские ре- плики (300, 600 и 1200 штрих./мм)	Не указано	

Светофильтры

Светофильтры широко применяются в люминесцентном анализе биополимеров и клеток. Их используют для выделения нужной спектральной области при возбуждении, для выделения спектра люминесценции, для уменьшения рассеянного света. Кроме того, они незаменимы при оценке спектрального состава сверхслабых световых потоков, когда применение светосильных монохроматоров оказывается неэффективным. Так, Картером с соавторами (Carter et al., 1964) описан прибор, в котором 50 узкополосных светофильтров служат для разложения в спектр сверхслабого ультрафиолетового и видимого свечения. Методика определения спектров свечения с помощью набора широкополосных светофильтров описана Васильевым (1965).

Светофильтры обычно классифицируют по принципу действия. Наибольшее распространение получили фильтры, основанные на явлениях интерференции и поглощения.

Узкополосные интерференционные светофильтры, действие которых основано на явлении многолучевой интерференции, позволяют выделить участок спектра шириной до 10 Å при коэффициенте пропускания в максимуме 50—60%. Подробно свойства таких фильтров описаны Голубевой и др. (1965). Для ультрафиолетовой области спектра интерференционные светофильтры производятся пока лишь в опытном порядке.

Абсорбционные светофильтры изготавливаются чаще всего из окрашенного стекла, поглощающего раствора или газа.

Стекланные фильтры, имеющие широкие области пропускания, серийно выпускаются промышленностью (см. каталог: Стекло цветное оптическое, 1960 г.).

Газовые и жидкостные светофильтры представляют собой кюветы с плоскопараллельными стенками, заполненные соответствующими веществами, которые пропускают свет в определенной области. Наполнителем газовых фильтров, работающих в ультрафиолетовой области, обычно служит хлор, бром или их смесь. Составы жидкостных ультрафиолетовых фильтров в большом количестве собраны в книге Макларена и Шугара (McLaren a. Shugar, 1964), где, в частности, приводятся рецепты отсекающих фильтров (аналогичных стеклянным типа БС) и полосовых с шириной полосы пропускания около 30 мкм, охватывающих область 240—380 мкм. Ван Эс и Виссе (Van Es a. Wisse, 1963) приводят несколько рецептов узкополосных фильтров для возбуждения люминесценции белков. Некоторые сведения о составе и применении жидкостных фильтров можно найти также в книгах Мейера и Зейтца (1952) и Шишловского (1961).

Нужно иметь в виду, что работа со светофильтрами в УФ области имеет свои особенности. Со временем изменяется пропускание некоторых светофильтров (соляризация стеклянных свето-

фильтров типа УФС; разложение жидкостных). Часть фильтров люминесцирует под действием коротковолнового УФ излучения, особенно фильтры типа БС.

На рис. 5.3 показано пропускание системы светофильтров, обычно используемых при наблюдении люминесценции белков

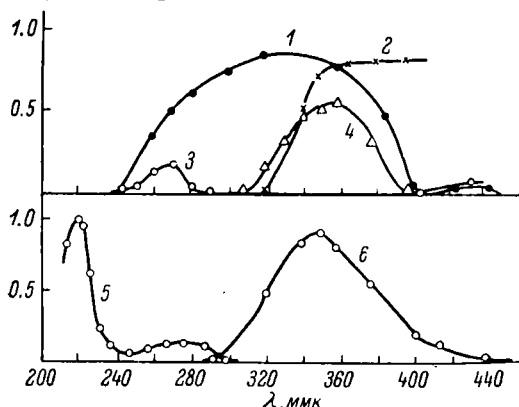


Рис. 5.3. Пропускание светофильтров, применяемых в исследовании люминесценции белков и ароматических аминокислот.

1 — УФС-1, 2 — БС-5, 3 — газовый хлорбромный, 4 — УФС-6.

Для сравнения показан спектр возбуждения раствора белка (5) и спектр его люминесценции (6).

и клеток, спектр возбуждения и флуоресценции которых приведен на том же рисунке.

Фотоэлектронные умножители

Практически во всех типах установок для регистрации свечения биополимеров и клеток используется ФЭУ. Описанию физических явлений, происходящих в ФЭУ, и применению их в различных областях техники посвящена обширная литература, основная часть которой собрана в монографиях Чечика и др. (1957), Матвеева и Соколова (1962), Гартмана и Бернгарда (Hartmann und Bernhard, 1957) и Биркса (Birks, 1964).

Следует отметить, что в большинстве книг и экспериментальных работ ФЭУ рассматриваются с точки зрения использования в сцинтилляционной радиометрии — наиболее распространенной области их применения.

Основными характеристиками ФЭУ являются: область спектральной чувствительности, величина интегральной чувствительности фотокатода, коэффициент усиления и темновой ток. ФЭУ, применяемые для регистрации люминесценции биологических

Таблица 5.3

ПАРАМЕТРЫ НЕКОТОРЫХ ФОТОУМНОЖИТЕЛЕЙ, РЕГИСТРИРУЮЩИХ УЛЬТРАФИОЛЕТОВОЕ ИЗЛУЧЕНИЕ

Тип фотоумножителя	Тип спектральной чувствительности	Область спектральной чувствительности (ммк)	Максимум спектральной чувствительности (ммк)	Рабочее напряжение (в)	Наименьшая интегральная чувствительность фотокаода $\left(\frac{\text{мкА}}{\text{лм}}\right)$	Интегральная анодная чувствительность $\left(\frac{\text{а}}{\text{лм}}\right)$	Наибольший темновой ток (а)	Наибольший ток на выходе (мА)
ФЭУ-18А	С-3	215—600	380 ± 50	900	20	10	$3 \cdot 10^{-9}$	0.1
ФЭУ-39	С-6	160—600	400 ± 20	1200	25	10	$3 \cdot 10^{-9}$	0.2
ФЭУ-46А	С-9	200—650	390 ± 50	1000	30	2	10^{-10}	1.0
ФЭУ-53	С-12	250—650	410 ± 10	1700	30	8	$4 \cdot 10^{-7}$	10
ФЭУ-57	С-14	255 ± 25	$230-280$	1700			$5 \cdot 10^{-8}$	1

Примечание. Таблица составлена на основании паспортов ФЭУ. Тип спектральной чувствительности ФЭУ определяется материалом фотокатода, подложки и окна. Для регистрации УФ излучения решающим является пропускание окна ФЭУ, поэтому у представленных в таблице ФЭУ окно выполнено из кварца или увиоля. Аналоги этих ФЭУ, выполненные в стеклянном баллоне (ФЭУ-17А; ФЭУ-37; ФЭУ-46), имеют спектральную характеристику типа С-6 и чувствительны в области 300—600 ммк.

объектов, должны быть чувствительны в УФ и видимой областях спектра и быть способны регистрировать световой поток, измеряемый десятками фотонов в секунду. К сожалению, таких «идеальных» фотоумножителей пока не существует, и экспериментатор, выбирая ФЭУ, в первую очередь обращает внимание на область спектральной чувствительности. В табл. 5.3 приведены характеристики отечественных ФЭУ, регистрирующих ультрафиолетовое излучение; характеристики типов фотокатодов для этих ФЭУ представлены на рис. 5.4.

В тех случаях, когда отсутствует ФЭУ, чувствительный в УФ области спектра, часто применяют трансформаторы излучения:

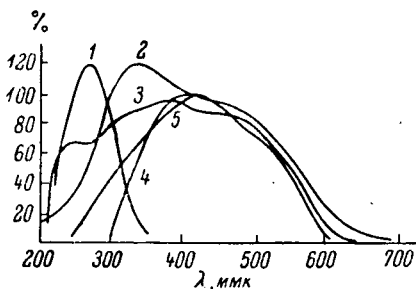


Рис. 5.4. Спектральные характеристики фотокатодов.

По оси ординат — относительная чувствительность фотокатода. 1 — C-14, 2 — C-9, 3 — C-3, 4 — C-6, 5 — C-12.

вещества, которые под действием света УФ-люминесценции сами люминесцируют в области спектральной чувствительности ФЭУ. Такие же люминофоры используются в качестве пропорционального счетчика фотонов для получения контрольного сигнала в схемах стабилизации источника света и автоматической коррекции спектров (см. раздел 6.1).

При выборе люминофора следует отдавать предпочтение тем, у которых энергетический выход люминесценции не зависит от

длины волны возбуждающего света: в этом случае спектральная чувствительность системы «ФЭУ—люминофор» будет постоянной. Для спектральной области 200—320 ммк такими люминофорами являются пленки с салициловокислым натрием ($\lambda_{\max} \sim 405$ ммк), эскулином ($\lambda_{\max} \sim 490$ ммк), антраценом ($\lambda_{\max} \sim 440$ ммк) и др. В качестве люминофора часто используют урановое стекло ЖС-19 ($\lambda_{\max} \sim 530$ ммк). Как показал Хлебников и др. (1961), комбинация тонкой (0.1 мм) пластинки уранового стекла с ФЭУ-46 позволяет расширить область спектральной чувствительности ФЭУ в коротковолновой УФ области до 140 ммк; причем в области 140—320 ммк чувствительность практически постоянная. Однако использование уранового стекла в качестве люминофора сопряжено с некоторыми неудобствами: максимум свечения лежит в желто-зеленой области ($\lambda_{\max} \sim 530$ ммк), что соответствует спаду на кривой чувствительности наиболее распространенных сурьмяно-цезиевых фотокатодов ($\lambda_{\max} \sim 400$ ммк); спектр возбуждения люминесценции имеет провал в области 370 ммк; эффективность преобразования уменьшается при использовании стекол толще 0.5 мм. Характеристики ряда люминофоров для преобразования УФ света в видимый приводят Мейер и Зейтц (1952) и Чечик

и др. (1957). Подбор ФЭУ для регистрации УФ излучения с помощью люминофора можно произвести по их данным, указанным в монографиях, посвященных ФЭУ. Описание некоторых ФЭУ (ФЭУ-28, ФЭУ-38, ФЭУ-51) приводят Лейтейзен и Глуховский (1964), ФЭУ типа «жалюзи» (ФЭУ-11—ФЭУ-16, ФЭУ-49, ФЭУ-52—ФЭУ-56) — Вильдгрубе и др. (1963, 1964). Данные зарубежных ФЭУ собраны в монографии Биркса (Birks, 1964); характеристики некоторых новых ФЭУ приводят Мазесон (Matheson, 1964) и Станлей (Stanley, 1964). Для регистрации УФ люминесценции (возбуждение: $\lambda_{\max} < 300$ мкм; излучение: $\lambda_{\max} > 300$ мкм) можно использовать ФЭУ с фотокатодом типа С-6, не чувствительные к возбуждающему свету (например, серийно выпускаемый малопшумящий ФЭУ-64).

5.2. МЕТОДЫ СНИЖЕНИЯ ШУМОВ ФЭУ

У включенного, но неосвещенного ФЭУ на выходе можно зарегистрировать темновой ток, величина которого в значительной степени определяет его порог чувствительности и который вызывается следующими причинами: 1) термоэлектронной эмиссией фотокатода и динодов, 2) проводимостью материала баллона ФЭУ, вызывающей ток утечки, 3) автоэлектронной эмиссией, 4) ионной и оптической обратной связью, 5) излучением изотопа K^{40} , содержащимся в стекле баллона ФЭУ.

Вклад, вносимый каждой из составляющих в суммарный темновой ток, неодинаков и зависит от режима работы, качества и конструкции ФЭУ. Для уменьшения темнового тока используют разнообразные приемы при конструировании и изготовлении ФЭУ. Так, например, термоэлектронную составляющую темнового тока снижают путем уменьшения площади фотокатода (ФЭУ-46) или путем введения в ФЭУ между фотокатодом и первым динодом специальных диафрагм, пропускающих фото- и термоэлектроны только с центральной части фотокатода (ФЭУ-64). Для снижения шумов, вызванных действием на фотокатод и диноды излучения изотопа K^{40} , содержащегося обычно в стекле баллона ФЭУ, и шумов, вызванных сцинтилляциями стекла баллона ФЭУ под действием этого же излучения (Флейшман и Шахиджаниян, 1959), в некоторых случаях колбу ФЭУ изготавливают из бескальевого стекла (ФЭУ-42). Это позволяет уменьшить среднюю амплитуду шумовых импульсов.

Таких конструктивных мер для снижения шумов ФЭУ может быть в принципе много. Однако они недоступны исследователю, пользующемуся уже готовыми ФЭУ, многие из которых часто не обеспечивают нужный порог чувствительности. В таких случаях применяют ряд методов, доступных в лабораторных условиях: выбирают оптимальный режим работы ФЭУ, используют магнитную дефокусирующую линзу, помещают ФЭУ в электростатический

экран и, наконец, охлаждают ФЭУ. Каждый из перечисленных методов можно использовать отдельно, или комбинируя друг с другом.

Выбор оптимальных межкаскадных напряжений позволяет подобрать режим, соответствующий максимальному усилению ФЭУ (Чечик и др., 1957), и существенно улучшить временные характеристики (Якушин и Тельнов, 1963). В частности, важное значение имеет оптимальный подбор напряжения на участке фотокатод—первый диод (Вильдгрубе и Ронкин, 1962; Walton, 1964).

Помещение фотокатода ФЭУ в магнитное поле (Naray, 1956; Авакян и др., 1963) эквивалентно уменьшению рабочей поверхности фотокатода и позволяет снизить величину шума примерно на два порядка. Применение указанного метода связано с необходимостью отвода с внутренней поверхности колбы ФЭУ накапливающегося там заряда и хорошей стабилизации тока в цепи магнитной линзы.

Электростатический экран (слой аквадага или металлический цилиндр, соприкасающийся с ФЭУ) под потенциалом фотокатода позволяет снизить темновой ток некоторых типов ФЭУ примерно на два порядка (Naray, 1956; Чечик и др., 1957; Hartmann u. Bernhard, 1957).

При повышении потенциала экрана наблюдается резкое возрастание уровня шума ФЭУ, которое достигает максимума при заземлении экрана. Поэтому надо полностью исключить возможность соприкосновения баллона ФЭУ с заземленным металлическим экраном, которым, в частности, может оказаться светозащитный кожух.

Следует отметить, что применение экрана дает эффект не для всех типов ФЭУ. Так, Перцев и др. (1963) обнаружили, что электростатический экран при потенциале фотокатода уменьшает на порядок абсолютное число шумовых импульсов у ФЭУ-А1 и, наоборот, увеличивает количество шумовых импульсов у ФЭУ-42 и ФЭУ-43.

В нашей лаборатории А. М. Кудашева и А. Плученничак показали, что электростатический экран не влияет на шумы ФЭУ-37, ФЭУ-39 и ФЭУ-64 и уменьшает на $\sim 40\%$ шумы ФЭУ-57.

Самым радикальным способом снижения шумов серийно выпускаемых ФЭУ является его охлаждение. При этом перед исследователем встает ряд вопросов: какой метод охлаждения избрать, какова оптимальная температура охлаждения и как изменяются при этом параметры ФЭУ.

Сравнение различных методов охлаждения ФЭУ

Существуют разнообразные системы, предназначенные для охлаждения ФЭУ, в которых хладагентом в основном служат твердая углекислота (-78°C) и жидкий азот (-196°C).

В установке для охлаждения торцевых ФЭУ твердой углекислотой (Васильев и др., 1961) ФЭУ заключался в герметический стальной кожух, который, в свою очередь, устанавливался в коробке из пенопласта. Пространство между ними заполнялось углекислотой, расход которого составлял 0.5—1 кг/час. Темновой ток для разных ФЭУ (ФЭУ-28, ФЭУ-29; ФЭУ-ВЭИ-2В) падал на 1—3 порядка.

При охлаждении жидким азотом применяются различные конструктивные приемы: охлаждение с помощью холодопровода (Чечик и др., 1957; Захаров и Шляпинтох, 1961), погружение ФЭУ в сосуд с жидким азотом (Владимиров и Литвин, 1959; Конев и Катибников, 1961; Тарусов и др., 1961), обдув ФЭУ парами жидкого или охлажденного азота (Баренбойм и др., 1964; Francin et al., 1965). Первый метод требует тщательного выполнения контакта ложа холодопровода с баллоном ФЭУ, второй — сосуд Дьюара соответствующих размеров с оптическим входом против фотокатода. Иногда ФЭУ помещают внутрь кожуха, который погружают в жидкий азот (Ошерович и др., 1962; Gandy a. Weller, 1964). В этом случае можно регулировать температуру ФЭУ нагревателем (Ошерович и др., 1962). Охлаждение ФЭУ до -196°C снижает темновой ток в некоторых случаях на четыре порядка. У ФЭУ-18, как это показано в работе Владимирова и Литвина (1959), шумы падают до 2—5 имп./мин. Ниже сравнивается ряд систем для охлаждения ФЭУ, которые были разработаны нами (Баренбойм и др., 1964, 1966).

Охлаждение ФЭУ парами жидкого азота. Схема установки представлена на рис. 5.5. Жидкий азот из сосуда Дьюара, в котором обычно транспортируется азот, испаряется нагревателем и по трубке подается внутрь термоизолированной

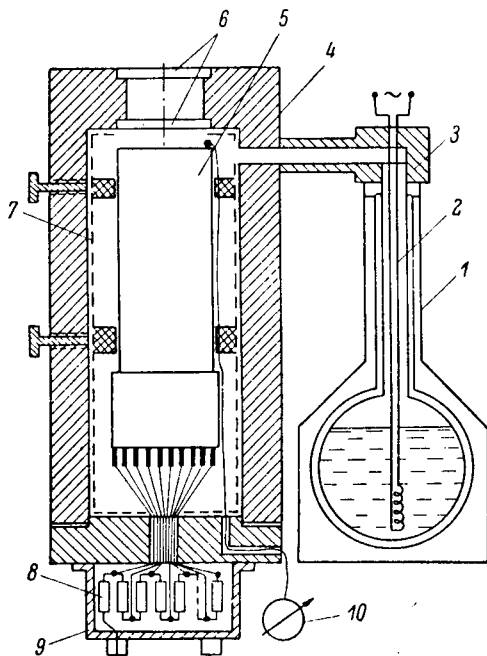


Рис. 5.5. Система охлаждения ФЭУ парами жидкого азота.

1 — сосуд Дьюара СД-15, 2 — нагреватель-испаритель, 3 — паропровод, 4 — кожух из текстолита, 5 — ФЭУ, 6 — кварцевые стекла, 7, 9 — экран, 8 — делитель напряжения ФЭУ, 10 — термопара с микроамперметром.

гильзы с ФЭУ. Меняя скорость испарения, можно плавно менять температуру внутри гильзы от комнатной до -150°C . Таким способом удобно охлаждать торцевые ФЭУ с полупрозрачным фотокатодом (типа ФЭУ-39, ФЭУ-46), для которых оптимальная температура охлаждения выбирается в зависимости от величины светового потока, как это показано в работе Баренбойма и др. (1966а). Для указанных ФЭУ при постоянной скорости испарения температурное равновесие устанавливается примерно через 1 час. После достижения равновесия колебания температуры торца ФЭУ не превышают $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$. Расход азота для достижения и поддержа-

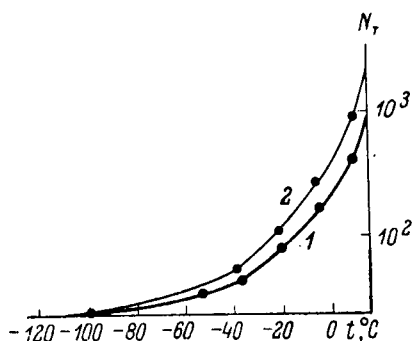


Рис. 5.6. Падение темнового тока ФЭУ при охлаждении.

По оси ординат — число импульсов в секунду. 1 — ФЭУ-39, 2 — ФЭУ-46А.

ния температуры -150°C составляет примерно 15 л/час, для -120°C — 3 л/час и для -60°C — 1 л/час. Собственный шум ФЭУ-39 и ФЭУ-46А при охлаждении их до -120°C уменьшается приблизительно в 150 раз (рис. 5.6).

Охлаждение ФЭУ через выводы фотокатода и динодов. У некоторых ФЭУ (ФЭУ-17, ФЭУ-20, ФЭУ-22 и др.) фотокатод расположен внутри баллона на массивной металлической подложке. Поэтому вместо колбы ФЭУ достаточно охладить ме-

таллические выводы в цоколе ФЭУ, которые будут служить холодопроводом к фотокатоду и динодам. Схема такой установки представлена на рис. 5.7.

На рис. 5.8 представлены зависимость температуры фотокатода от времени охлаждения и падение темнового тока ФЭУ-18. Температурное равновесие устанавливается через 50–60 мин., при этом температура фотокатода достигает -120°C и темновой ток составляет 5–6 имп./сек. Расход азота составляет около 4 л за первые 5 час. работы.

Охлаждение ФЭУ путем погружения в жидкий азот. ФЭУ-18 погружается в жидкий азот, заполняющий кварцевый сосуд Дьюара с оптическими выходами [аналогично тому, как это описано в работе Владимирова и Литвина (1959)]. Температурное равновесие достигается через 15–20 мин., собственный шум падает до 2–3 имп./сек. (рис. 5.8). Расход азота не превышает 2 л за первые 5 час. работы.

ФЭУ-46А (как и ФЭУ-39), как правило, не выдерживает непосредственного погружения в жидкий азот. Поэтому эти ФЭУ заключают в металлическую гильзу, укрепленную внутри теплоизолированного металлического сосуда с жидким азотом (рис. 5.9).

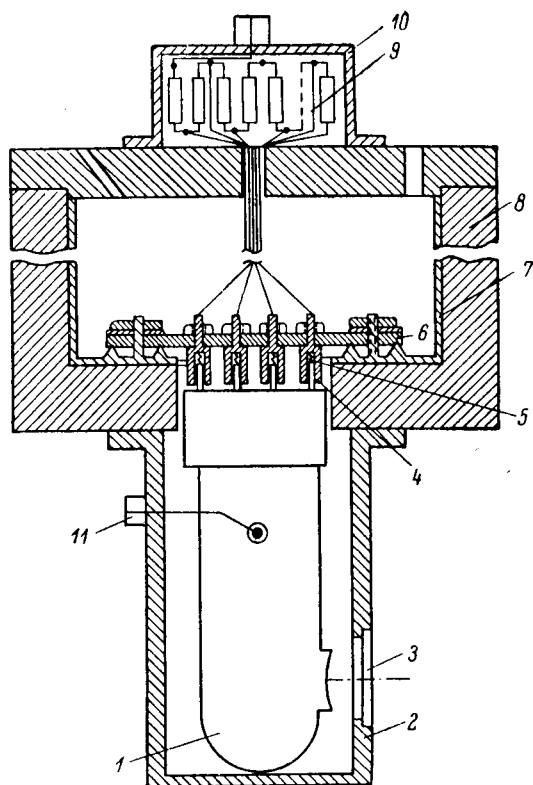


Рис. 5.7. Система охлаждения ФЭУ через выводы фотокатода и динодов.

1 — ФЭУ, 2 — кожух ФЭУ, 3 — кварцевое окно, 4 — медные держатели-холодопроводы, 5 — контактные пружины, 6 — панель из фторопласта, 7 — металлический сосуд для жидкого азота, 8 — пенопластовый теплоизолятор, 9 — делитель напряжения ФЭУ, 10 — экран, 11 — вывод анода ФЭУ.

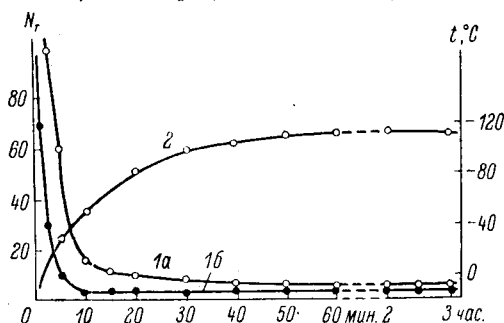


Рис. 5. 8. Временные характеристики ФЭУ-18А, охлажденного через выводы.

По оси абсцисс — длительность охлаждения, по оси ординат: слева — число импульсов в секунду, справа — температура. 1а — собственный шум ФЭУ, 1б — то же при прямом погружении ФЭУ в жидкий азот, 2 — температура фотокатода.

Торец ФЭУ плотно прижимается ко дну гильзы для лучшего теплового контакта.

Падение темнового тока и температуры во времени при охлаждении ФЭУ-46А в гильзе, погруженной в жидкий азот, пред-

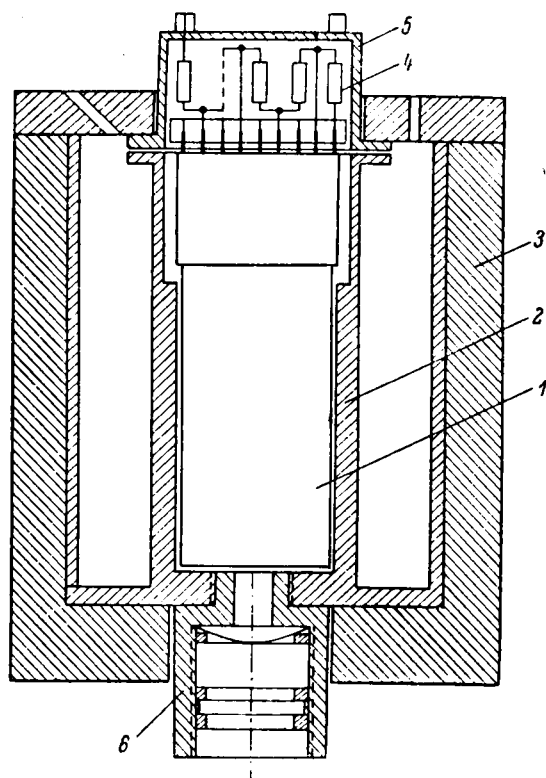


Рис. 5.9. Система охлаждения торцевого ФЭУ в гильзе.

1 — ФЭУ, 2 — металлическая гильза, 3 — пенопластовый термоизолятор, 4 — делитель напряжения, 5 — экран, 6 — эбонитовая втулка с оптикой.

ставлено на рис. 5.10. Стабильная температура (-188°C) устанавливается через 40 мин. после начала охлаждения, собственные шумы при этом составляли 3—4 имп./сек. Расход азота составляет примерно 3 л за первые 5 час. работы.

Таким образом, торцевые ФЭУ удобно охлаждать парами жидкого азота. При сравнительно простой конструкции этот метод позволяет получать любую температуру в широком диапа-

зоне, от комнатной до -150°C . Однако при охлаждении парами ниже -120°C расходуется значительное количество жидкого азота. Охлаждение ФЭУ путем погружения в жидкий азот позволяет получить наименьший уровень шумов при минимальном расходе азота, но этот метод возможен не для всех типов ФЭУ и связан с частичными потерями света при прохождении его через слой жидкого азота. Способ охлаждения ФЭУ через выводы фотокатода и динодов свободен от недостатков, присущих прямому погружению. Однако такая система конструктивно сложнее и пригодна для сравнительно небольшого числа ФЭУ специфической конструкции.

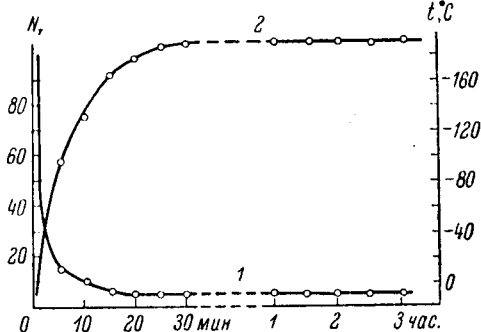


Рис. 5.10. Временные характеристики ФЭУ-46А, охлажденного в гильзе.

1 — собственный шум, 2 — температура фотокатода. Остальные обозначения те же, что и на рис. 5.8.

Характеристики охлажденных ФЭУ

Известно, что при охлаждении в общем случае меняется чувствительность ФЭУ. Изменение чувствительности зависит от типа

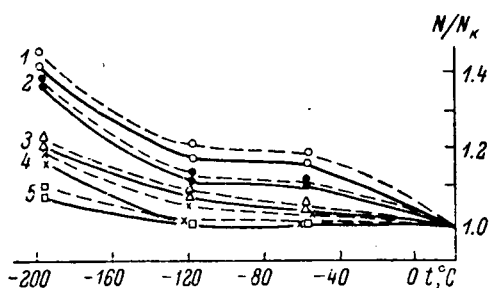


Рис. 5.11. Изменение чувствительности ФЭУ-57 к слабым и сильным световым потокам при охлаждении.

По оси абсцисс — температура, по оси ординат — отношение сигналов при низкой и комнатной температурах. Длина волны (нм): 1 — 436, 2 — 365, 3 — 313, 4 — 556, 5 — 296. Сплошные линии — сильные световые потоки, штриховые — слабые.

фоточувствительного слоя, длины волны падающего света и, главное, от наличия подложки у фотокатода (ФК). По последнему признаку ФЭУ можно разбить на 3 группы: 1) с фотослоем на массивной металлической подложке (ФЭУ-17, ФЭУ-18 и др.); 2) с фотослоем на стекле, имеющем полупрозрачную проводящую подложку (жалюзные ФЭУ с сурьмяно-цезиевым ФК, некоторые ФЭУ-ВЭИ); 3) с фотослоем на стекле без подложки (ФЭУ-19, ФЭУ-39, ФЭУ-46 и др.).

Для ФЭУ 1-й и 2-й групп установлено незначительное изменение чувствительности при охлаждении (Родионов и Ошерович,

1950; Ошерович и др., 1962; Вильдгрубе и др., 1963; Скачков, 1964). Так, в наших измерениях у ФЭУ-57 (ФЭУ 2-й группы) изменение чувствительности при охлаждении носило одинаковый характер для слабых и сильных световых порогов: чувствительность возрастала в 1.1—1.5 раза (рис. 5.11) и стабильное значение ее устанавливалось мгновенно. Известно, что у ФЭУ 3-й группы начиная с температуры -60°C чувствительность понижается и при -196°C уменьшается в 50—80 раз (Матвеев и др., 1962; Ошерович и др., 1962).

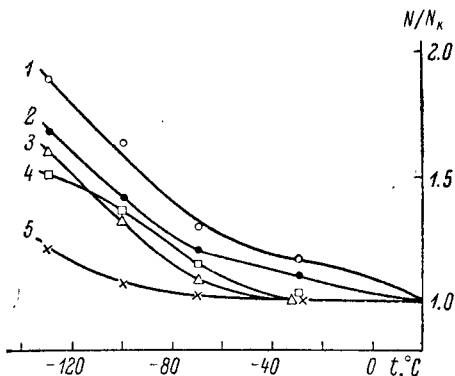


Рис. 5.12. Изменение чувствительности ФЭУ-39 к слабым световым потокам при охлаждении.

Длина волны (ммк): 1 — 312,6, 2 — 365, 3 — 254, 4 — 436, 5 — 546. Остальные обозначения те же, что и на рис. 5.11.

Падение чувствительности ФЭУ 3-й группы при охлаждении можно объяснить, используя представления о механизме падения чувствительности фотоэлементов с ФК такого же типа (Моргулис и Дятловицкая, 1940). Для любой точки A ФК справедливо соотношение

$$V_A = V - IR_{\text{эфф}}, \quad (5.1)$$

где V_A — истинная разность потенциалов между указанной точкой и динодом, V — разность потенциалов между выводами ФК и первого динода, I — фототок, $R_{\text{эфф}}$ — эффективное сопротивление между точкой A и выводами ФК.

Если V_s — потенциал насыщения отбираемого фототока, то при $V_A \gg V_s$ все фотоэлектроны собираются на анод. С понижением температуры растет $R_{\text{эфф}}$ и при постоянном световом потоке уменьшается V_A . Когда V_A становится меньше V_s , собираются уже не все фотоэлектроны, чувствительность падает. Кроме того, уменьшение V_A приводит к уменьшению энергии фотоэлектронов и, следовательно, к уменьшению вторичной эмиссии.

Из формулы (5.1) следует, что с уменьшением фототока I V_A может снова достигнуть V_s и чувствительность восстановится. Уменьшить I можно как снижая интенсивность светового потока, так и подавая на ФЭУ свет такого спектрального состава, к которому ФК малочувствителен. Можно предположить, что при малых I чувствительность ФЭУ 3-й группы будет сохраняться вплоть до очень низких температур, что несомненно представляет практический интерес. Эти выводы проверялись Баренбоймом и др. (1966а; 1966б). В качестве представителей ФЭУ 3-й группы были выбраны широко распространенные ФЭУ-39 и ФЭУ-46А. Для «слабых» световых потоков ($\sim 5 \cdot 10^3$ фотонов/сек.) у этих ФЭУ

при всех длинах волн (кроме $\lambda=546$ ммк для ФЭУ-46А) изменение чувствительности при охлаждении носило одинаковый характер: чувствительность возрастала в 1.1—1.8 раз при охлаждении до -120°C (рис. 5.12, 5.13).

Если световые потоки достаточно велики (например, при фототоке около $5 \cdot 10^{-8}\text{a}$, чему расчетно соответствует световой поток $5 \cdot 10^5$ фотонов/сек.), то начиная с некоторой температуры чувствительность резко падает; на рис. 5.14 для кривой 2б световой поток в 5 раз больше, чем для кривой 2а. У ФЭУ-39 под действием светового потока, соответствующего анодному току $5 \cdot 10^{-8}\text{a}$, такое падение начинается при температурах ниже -80°C .

Постоянное значение чувствительности к данному «сильному» световому потоку устанавливается не мгновенно. Так, например,

при -140°C в первый момент после облучения ФК таким световым потоком чувствительность ФЭУ соответствует чувствительности к «слабым» световым потокам при данной температуре (рис. 5.14, кривая 5б), затем начинает падать и через 2—3 мин. достигает постоянного значения (кривая 5а). Если прекратить засветку, то чувствительность восстанавливается еще медленнее, чем падает — через 30—40 мин.

Такие медленные изменения чувствительности можно объяснить, рассматривая скорость установления стационарного состояния потенциалов точек ФК. Эта скорость

характеризуется временем релаксации $T = \frac{\epsilon}{4\pi\sigma}$, где ϵ — диэлектрическая проницаемость, σ — удельная электропроводность. Со-

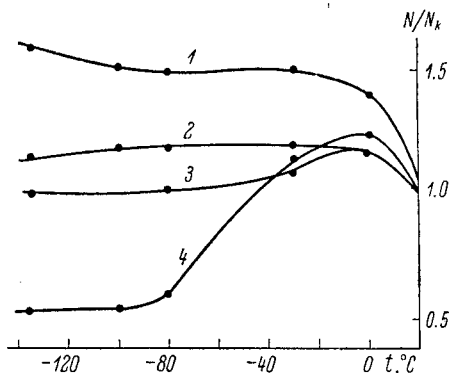


Рис. 5.13. Изменение чувствительности ФЭУ-46А к слабым световым потокам при охлаждении.

Длина волны (ммк): 1 — 312,6, 2 — 365, 3 — 436, 4 — 546. Остальные обозначения те же, что и на рис. 5.11.

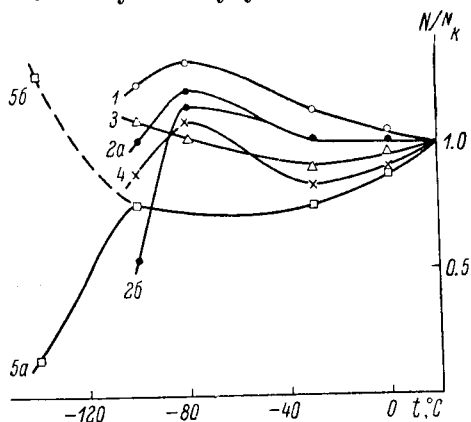


Рис. 5.14. Изменение чувствительности ФЭУ-39 к сильным световым потокам при охлаждении.

Длина волны (ммк): 1 — 312,6, 2а и 2б — 365, 3 — 254, 4 — 436, 5а и 5б — 546. Остальные обозначения те же, что и на рис. 5.11.

противление ФК при комнатной температуре велико (удельное поверхностное сопротивление равно 10^7 — 10^9 ом) и при понижении температуры значительно возрастает. Соответственно увеличивается T , и стационарное состояние потенциала точек ФК устанавливается достаточно долго, если с ФК выбито много электронов. Все это сказывается на чувствительности к «слабым» световым потокам гораздо меньше, так как значения потенциалов точек ФК изменяются незначительно.

Итак, у охлажденных ФЭУ 3-й группы чувствительность к «слабым» световым потокам сохраняется практически неизменной, а к «сильным» — уменьшается, устанавливаясь на постоянном уровне с запозданием в 2—3 мин. Это ограничивает возможность регистрации «сильных» и «слабых» световых потоков на одной установке, в которой используется ФЭУ, охлажденный до температуры жидкого азота. Такие ограничения могут возникнуть при измерении светового потока, интенсивность которого резко меняется во времени, например, при изучении рекомбинационного свечения, фосфоресценции или термолюминесценции тех объектов, для которых время затухания свечения превышает время релаксации полупроводникового слоя ФК. Совместные измерения «сильных» и «слабых» световых потоков могут производиться лишь в некоторых частных случаях: при кратковременном потоке, при большом перерыве между измерениями и т. д.

В общем случае ФЭУ 3-й группы целесообразно охлаждать не ниже -70 — -80°C . При этой температуре чувствительность почти не меняется, а падение темнового тока на два порядка дает желаемое увеличение отношения сигнал/шум.

5.3. СРАВНЕНИЕ МЕТОДОВ РЕГИСТРАЦИИ СИГНАЛОВ С ФЭУ

Как известно, кванты света, попадая на фотокатод ФЭУ, выбивают электроны, которые, умножаясь на динодах, вызывают в анодной цепи ФЭУ серию импульсов. Поэтому сигнал с ФЭУ можно регистрировать двумя принципиально различными методами: либо, проинтегрировав импульсы, измерять средний ток, либо прямо сосчитывать импульсы.

Измерение фототока

При регистрации среднего значения тока в цепи анод—последний динод могут встретиться два случая: сигнал на выходе ФЭУ может быть постоянным или модулированным по амплитуде (если периодически прерывается световой поток или изменяется усиление ФЭУ). В первом случае сигнал регистрируют с помощью усилителя постоянного тока, во втором — с помощью избирательного усилителя. Минимальный световой поток, который можно

зарегистрировать каждым из этих способов, различен, поэтому при регистрации слабых световых потоков важен выбор оптимального метода регистрации.

Порог чувствительности при регистрации и постоянного тока. Минимальный световой поток $F_{\text{н}}$, который можно зарегистрировать системой ФЭУ—усилитель постоянного тока, определяется величиной темнового тока $I_{\text{т}}$, а при компенсации постоянной составляющей $I_{\text{т}}$ — дробовым эффектом темнового тока. Дробовой эффект связан с тем, что процесс испускания термоэлектронов фотокатодом носит статистический характер, и поэтому число электронов, бомбардирующих анод, флуктуирует во времени. С учетом дробового эффекта $F_{\text{н}}$ выражается через параметры ФЭУ следующим образом (Чечик и др., 1957):

$$F_{\text{н}} = \sqrt{\frac{e(1+B)}{R_{\text{г}}C}} \cdot \sqrt{\frac{I_{\text{т}}}{\gamma_{\text{а}}\gamma_{\text{ф}}}}, \quad (5.2)$$

где e — заряд электрона, $1+B$ — величина, учитывающая влияние диодной системы на флуктуации дробового эффекта (для ФЭУ с электростатической фокусировкой эта величина находится в пределах 1.5—3), $R_{\text{г}}$ — сопротивление изоляции между выводами анода и другими электродами, C — емкость участка анод—последний диод, $\gamma_{\text{а}}$ и $\gamma_{\text{ф}}$ — чувствительность анода и фотокатода соответственно.

Из формулы 5.2 следует, что порог чувствительности может быть понижен путем увеличения сопротивления изоляции анода, увеличения чувствительности фотокатода, сужения полосы регистрируемых частот и уменьшения темнового тока. Сопротивление изоляции анода и темновой ток меняются в выгодную сторону при охлаждении ФЭУ. Однако в этом случае важно учитывать не только шумы, создаваемые темновым током, но и флуктуации фототока. Тогда выигрыш, получаемый от применения охлажденного ФЭУ, выражается следующим образом:

$$\frac{\rho_2}{\rho_1} = \sqrt{\frac{I_{\text{ф}} + I_{\text{т}_1}}{I_{\text{ф}} + I_{\text{т}_2}}}, \quad (5.3)$$

где ρ_1 и ρ_2 — отношения сигнал/шум при комнатной и низкой температурах, $I_{\text{ф}}$ — фототок, $I_{\text{т}_1}$ и $I_{\text{т}_2}$ — темновой ток при комнатной и низкой температурах.

Если $I_{\text{ф}} \geq I_{\text{т}_1} > I_{\text{т}_2}$, то выигрыша от охлаждения ФЭУ практически нет, так как ρ_2/ρ_1 мало отличается от единицы. Существенный выигрыш получается при $I_{\text{т}_1} \gg I_{\text{ф}} \gg I_{\text{т}_2}$; в этом случае $\rho_2/\rho_1 = \sqrt{I_{\text{т}_1}/I_{\text{ф}}}$ и выигрыш при охлаждении определяется тем, насколько хорошо выполняется условие $I_{\text{ф}} > I_{\text{т}_2}$. Отсюда следует важность сбора света (увеличение $I_{\text{ф}}$) для получения максималь-

ного значения ρ_2 и для соответствия максимальному эффекту охлаждения (ρ_2/ρ_1).

Минимальному световому потоку, который можно регистрировать усилителем постоянного тока, должен соответствовать сигнал на выходе ФЭУ порядка 10^{-11} а. Усилители постоянного тока, регистрирующие такие сигналы, сравнительно просты, не обладают большой постоянной времени и дрейфом нуля. Подобные усилители серийно выпускаются промышленностью, например ЭМУ-4, усилитель микрорентгенометра «Кактус» и др. ФЭУ в этом случае имеет смысл охлаждать до температуры порядка -80°C , при которой темновой ток снижается более чем на два порядка.

Порог чувствительности при регистрации модулированного сигнала. Если световой поток (или напряжение на одном из диодов) модулирован (Сущинский, 1950; Борисов, 1960; Гавриленко и др., 1962; Groves, 1965), то сигнал усиливается избирательным усилителем, детектируется, как правило, синхронным детектором и далее регистрируется стрелочным или записывающим прибором. Эта система регистрации обладает рядом преимуществ перед использованием усилителей постоянного тока: 1) позволяет сравнительно просто осуществлять большое усиление сигнала, 2) не имеет дрейфа нуля, 3) позволяет при изучении фотолюминесценции, комбинационного рассеяния света и т. п. использовать питание газоразрядных источников света переменным током в качестве метода модуляции светового потока, 4) позволяет уменьшить порог чувствительности ФЭУ примерно на порядок и довести его до 50 фотоэлектронов в секунду (Борисов, 1960). Такой порог достигается за счет того, что при модуляции устраняется влияние постоянной составляющей темнового тока. Кроме того, узкополосное усиление и синхронное детектирование уменьшает регистрируемую термоэлектронную эмиссию. Это происходит потому, что шумы в силу своей статистической природы характеризуются широким набором частот, а усилитель избирательно настроен на частоту модуляции светового потока. Дальнейшее понижение порога чувствительности связано, по-видимому, с принципиальными трудностями. Если световой поток таков, что частота следования фотоэлектронов ниже частоты модуляции, то сигнал на выходе ФЭУ не всегда будет меняться с частотой модуляции, так как фотоны могут не попадать на фотокатод в каждый период.

Относительная величина таких среднеквадратичных флуктуаций δ (Ван дер Зил, 1958) выражается соотношением

$$\delta = \frac{1}{\sqrt{N}} \sqrt{\frac{\sigma}{\sigma - 1}}, \quad (5.4)$$

где N — число электронов, вылетающих из фотокатода за полу-

период модуляции, σ — коэффициент вторичной эмиссии. Условие удовлетворительной регистрации соответствует $\delta < 1$. Если положить, что $\delta = 1/3$, а $\sigma = 5$, то для выполнения этих условий из фотокатода должно вылетать около десяти фотоэлектронов за полупериод. При частоте модуляции 30 гц минимальный световой поток, отвечающий поставленному условию, будет $30 \cdot 10 \cdot 2 = 600$ фотоэлектронов/сек. При этом необходимо иметь в виду, что длительность периода модуляции предполагается близкой к постоянной времени регистрирующей системы.

Приведенный расчет показывает, что повышение частоты модуляции при неизменных световом потоке и постоянной времени регистрирующего прибора должно приводить к увеличению флуктуаций. Такой эффект наблюдал Ксанфомалити (1962), который рекомендует выбирать оптимальную частоту модуляции по построенным для каждого экземпляра ФЭУ кривым зависимости величины флуктуаций от напряжения питания и частоты модуляции для данного светового потока.

Следуя этим соображениям, можно прийти к выводу, что оптимальными должны быть низкие частоты модуляции. Однако снижение частоты модуляции затрудняет регистрацию свечения в кинетическом эксперименте; кроме того, очень низкие частоты модуляции неудобны по техническим соображениям. Поэтому порог, близкий к 50 фотоэлектронам/сек., которому соответствует минимальная частота модуляции в несколько десятков герц, по-видимому, является пределом для установки с регистрацией модулированного сигнала. В этом случае ФЭУ целесообразно охлаждать до температуры, снижающей темновой ток до величины порядка 30 термоэлектронов/сек.

Если частота модуляции составляет сотни герц, то применять охлаждение ФЭУ не выгодно, так как условию удовлетворительной регистрации должен соответствовать световой поток порядка нескольких тысяч фотоэлектронов/сек., а собственные шумы ФЭУ при комнатной температуре составляют величину, близкую к 10^3 имп./сек. Эти соображения подтверждают данные Ксанфомалити (1962), согласно которым регистрация модулированного такой частотой светового потока охлажденным ФЭУ не дала сколько-либо серьезного результата.

Недостатками рассматриваемого метода регистрации являются необходимость с большой точностью поддерживать частоту модуляции при регистрации избирательным усилителем и отсутствие серийно выпускаемых приборов, осуществляющих регистрацию модулированного сигнала с ФЭУ.

Счет импульсов

Каждый электрон, вылетающий из фотокатода ФЭУ, превращается на аноде в импульс с длительностью порядка 10^{-9} сек., состоящий приблизительно из M электронов (M — коэффициент

усиления ФЭУ). Такие импульсы, учитывая их происхождение, принято называть одноэлектронными. Так как собственная длительность импульса очень мала, то при усилении его параметры будут в первую очередь определять постоянную времени входной цепи. Например, при входной емкости 10 пф и сопротивлении нагрузки $R_n = 10$ ком длительность усиливаемого импульса будет $\tau = 10^{-11} \cdot 10^4 = 10^{-7}$ сек., а амплитуда $U = \frac{eM}{\tau} \cdot R_n$, где e —

заряд электронов. Если положить, что $M = 10^6$, то при указанных значениях остальных параметров $U = 16$ мв. Усиление и счет таких импульсов не представляют трудностей и легко могут быть осуществлены с помощью серийно выпускаемых приборов. Обычно для этих целей применяются усилители импульсов типа УШ-2 «Сирень» и УШ-10 «Эвкалипт», пересчетные приборы типа ПС-10000 «Флокс» и ПП-8 «Волна», измерители скорости счета типа ИСС-3 и «Тюльпан» или счетная стойка типа ССД.

Метод счета импульсов позволяет полностью использовать преимущество малошумящего ФЭУ: число фотоимпульсов N , которое можно зарегистрировать за время τ , определяется только числом импульсов фона N_ϕ . Относительная ошибка счета выражается следующей формулой (Чечик и др., 1957):

$$\eta = \frac{\sqrt{N + N_\phi}}{N - N_\phi}, \quad (5.5)$$

из которой непосредственно вытекает существенное значение снижения фона при счете импульсов. Однако отсюда не следует, что если N_ϕ стремится к 0, то и N также стремится к 0. При очень малых N_ϕ порог чувствительности ограничивается флуктуациями светового потока. Подробно этот вопрос рассмотрен в работе Ратнера (1960). Если при выбранном τ $N_\phi \rightarrow 0$, то порог чувствительности стремится к постоянной величине. Так, например, поток, который при данном N_ϕ можно обнаружить в одном измерении с вероятностью 0.84, равен: $N = 1 + \sqrt{0.75 + 2N_\phi}$. Если $N_\phi \rightarrow 0$, то $N \rightarrow 1.85$. Таким образом, уменьшать фон при постоянном времени измерения можно только до определенной величины. Дальнейшее понижение фона имеет смысл только при одновременном увеличении времени регистрации. Это относится прежде всего к наблюдению хемилюминесценции биологических объектов, поскольку она очень слаба.

Метод счета импульсов дает наилучшие результаты при использовании небольшого числа типов ФЭУ, у которых амплитудное распределение одноэлектронных импульсов подчинено закону Пуассона (см. раздел 5.5).

Максимальный световой поток, который может быть зарегистрирован таким способом, в принципе ограничен быстродействием пересчетных устройств, большинство из которых не может

регистрировать больше 10^8 имп./сек. Однако практически нелинейность счета при изменении светового потока наступает раньше, примерно при скорости счета 10^4 имп./сек. Это явление можно объяснить как просчетами пересчетного устройства из-за статистического распределения частоты следования импульсов, так и эффектом автодискриминации, который будет рассмотрен в разделе 5.4.

* * *

Таким образом, для измерений в широком диапазоне световых потоков — от отдельных фотонов до достаточно сильных лучей — в одной установке должны сочетаться методы усиления постоянного тока и счета импульсов. Второй метод требует применения малощумящего (охлажденного) ФЭУ. Граница перехода от одного метода регистрации к другому лежит в области 10^4 имп./сек., чему соответствует анодный ток ФЭУ 10^{-9} — 10^{-10} а.

Если световой поток не превышает 50—100 фотоэлектронов/сек., то предпочтение следует отдать системе регистрации с модуляцией — методу, не предъявляющему высоких требований к параметрам ФЭУ.

5.4. НЕКОТОРЫЕ ОСОБЕННОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДА СЧЕТА ИМПУЛЬСОВ

Отдельные фотоны, попадая на фотокатод, приводят к образованию одноэлектронных импульсов.

Метод счета импульсов имеет ряд особенностей, связанных прежде всего с режимом работы ФЭУ, параметрами импульсных усилителей и пересчетных приборов.

В ы б о р п а р а м е т р о в в х о д н о й ц е п и. При счете импульсов амплитуду сигнала $U_{\text{сигн}}$, создаваемого импульсом с ФЭУ на нагрузке (которой являются входная емкость $C_{\text{вх}}$ и входное сопротивление $R_{\text{н}}$), можно описать следующей формулой:

$$U_{\text{сигн}} = i_{\text{ФЭУ}} R_{\text{н}} \left(1 - e^{-\frac{\tau_{\text{ФЭУ}}}{R_{\text{н}} \cdot C_{\text{вх}}}} \right), \quad (5.6)$$

где $\tau_{\text{ФЭУ}}$ — длительность импульса тока ФЭУ, $i_{\text{ФЭУ}}$ — амплитуда импульса тока ФЭУ. $U_{\text{сигн}}$ достигает максимума при данном $C_{\text{вх}}$, когда $\frac{\tau_{\text{ФЭУ}}}{R_{\text{н}} \cdot C_{\text{вх}}} \rightarrow 0$, при этом $U_{\text{сигн}} \rightarrow U_{\text{сигн}}^{\text{max}} = \frac{i_{\text{ФЭУ}} \cdot \tau_{\text{ФЭУ}}}{C_{\text{вх}}}$. Следовательно, для того чтобы $U_{\text{сигн}}$ было как можно больше, необходимо, чтобы $C_{\text{вх}}$ была минимальна и $R_{\text{н}} C_{\text{вх}} > \tau_{\text{ФЭУ}}$.

Практически последнее соотношение выполняется уже при $R_{\text{н}} \cdot C_{\text{вх}} \cong 10 \tau_{\text{ФЭУ}}$. Обычно $\tau_{\text{ФЭУ}} = 10^{-8} \div 10^{-9}$ сек. и $C_{\text{вх}} \cong 10$ пф. Отсюда

$$R_{\text{н}} = \frac{10 \tau_{\text{ФЭУ}}}{C_{\text{вх}}} = \frac{10 \cdot 10^{-8}}{10^{-11}} = 10^4 \text{ ом.}$$

Таким образом, сопротивление нагрузки должно быть не менее 10 ком. Верхний предел сопротивления нагрузки ограничивается следующими факторами.

1. Появлением просчетов в регистрирующей схеме, когда длительность отдельных импульсов τ становится сравнимой со средним периодом следования импульсов T .

2. Флуктуационным напряжением тепловых шумов сопротивления ($U_{\text{ш}}$), возрастающими с увеличением R_n . Поскольку увеличение R_n выше 10 ком (при постоянных $C_{\text{вх}}$ и $\tau_{\text{ФЭУ}}$) не приводит к сколько-нибудь заметному возрастанию амплитуды сигнала, а $U_{\text{ш}}^2 = 4kTR_n \cdot \Delta f$, то появление шумов с ростом R_n должно приводить к уменьшению отношения сигнал/шум.

3. Возрастанием различных помех (наводок и т. п.) с увеличением сопротивления нагрузки.

4. Просчетами, вызванными накоплением некоторого потенциала на переходной емкости, связанной с управляющей сеткой лампы дискриминатора. Такое накопление приводит к дополнительному смещению уровня дискриминации, равному по величине постоянной составляющей усиленных импульсов. В результате импульсы с амплитудами порядка этой постоянной составляющей и меньше ее не сосчитываются, т. е. возникает явление автодискриминации. Число просчетов, таким образом, зависит от величины постоянной составляющей проходящих импульсов, которая в свою очередь определяется средней скважностью этих импульсов Q . При уменьшении скважности смещение уровня дискриминации будет увеличиваться и соответственно возрастет доля не сосчитываемых импульсов. Очевидно, существует пороговая величина скважности $Q_{\text{пор}}$, выше которой погрешности в просчетах импульсов становятся незначительными. Так как $Q = T/\tau$, то при данном T можно найти максимальную длительность импульса $\tau_{\text{пор}}$ (соответствующую $Q_{\text{пор}}$), превышение которой будет приводить к появлению просчетов. Поскольку длительность импульса непосредственно связана с постоянной времени входной цепи (обычно $\tau = 2R_n \cdot C_{\text{вх}}$), то при данной скорости счета $N = 1/T$ можно определить максимальную величину $R_n \cdot C_{\text{вх}}$, соответствующую $Q_{\text{пор}}$.

Можно принять $Q_{\text{пор}} = 50$. Это соответствует тому, что импульсы с амплитудой менее 1/50 средней их величины (в одноэлектронном амплитудном распределении импульсов ФЭУ) не будут сосчитываться. Если положить, что $N = 10^4$ имп./сек., то $\tau_{\text{пор}} = \frac{T}{Q_{\text{пор}}} = \frac{1}{Q_{\text{пор}} \cdot N} = \frac{10^{-4}}{50} = 2 \cdot 10^{-6}$ сек., и так как обычно $C_{\text{вх}} = 10$ пф, то $R_n^{\text{max}} \approx \frac{\tau_{\text{пор}}}{2C_{\text{вх}}} = \frac{2 \cdot 10^{-6}}{2 \cdot 10^{-11}} = 10^5$ ом.

Таким образом, эффект автодискриминации накладывает ограничение на максимальную величину R_n . Она должна быть такой, чтобы при данной $C_{\text{вх}}$ постоянная времени входной цепи $R_n \cdot C_{\text{вх}}$

не превышала $\tau_{\text{пор}}/2$, причем величина $\tau_{\text{пор}}$ рассчитывается, исходя из величины сигнала N и величины пороговой скважности $Q_{\text{пор}}$. Следовательно, если ФЭУ работает в режиме счета импульсов, то оптимальные величины параметров входной цепи определяются соотношением

$$\frac{\tau_{\text{пор}}}{2C_{\text{вх}}} > R \geq \frac{10\tau_{\text{ФЭУ}}}{C_{\text{вх}}}. \quad (5.7)$$

Амплитудное распределение импульсов на выходе ФЭУ и применение дискриминации для увеличения отношения сигнал/шум. Если освещать ФЭУ постоянным световым потоком и регистрировать импульсы на выходе, то амплитуды этих импульсов не будут одинаковы — величины амплитуд будут распределяться по определенному статистическому закону. Если эти законы для фотоимпульсов и шумовых импульсов различны, то можно применять амплитудную дискриминацию для отделения одних импульсов от других. С другой стороны, при совпадении амплитудного распределения шума и сигнала применение дискриминации не даст никакого выигрыша. Следовательно, вопрос о целесообразности использования дискриминации решается при сравнении распределения по амплитудам импульсов сигнала и шума.

Как уже говорилось в разделе 5.3, собственные шумы ФЭУ частично обусловлены термоэлектронной и автоэлектронной эмиссией. Степень этой обусловленности определяется конструкцией и режимом работы ФЭУ.

Термоэмиссия фотокатода представляет собой, как показали Хлебников и др. (1962), одноэлектронный процесс (поток одиночных электронов), и если темновой ток ФЭУ обусловлен только термоэлектронами фотокатода, то тогда его величина I , зарегистрированная гальванометром на выходе ФЭУ, будет численно равна расчетной величине этого тока, выраженной через число импульсов N на выходе ФЭУ, заряд электрона e и коэффициент усиления ФЭУ M , т. е. $I = eMN$. Практически это соотношение выполняется для очень небольшого числа ФЭУ (ФЭУ-А1, ФЭУ-42, ФЭУ-43). Для большинства серийно выпускаемых ФЭУ $I \gg eMN$, т. е. преобладают шумы нетермоэлектронной природы.

Если определить зависимость числа импульсов на выходе ФЭУ

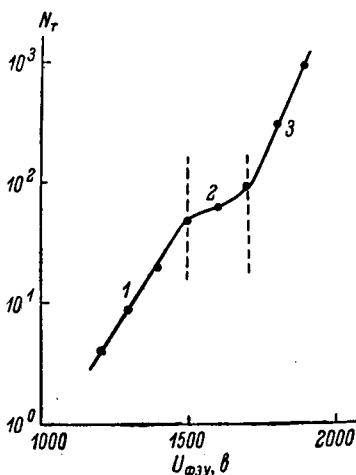


Рис. 5.15. Счетная характеристика ФЭУ.

По оси абсцисс — напряжение питания, по оси ординат — число импульсов в секунду. Остальные обозначения в тексте.

от напряжения питания (рис. 5.15), то по этой зависимости также можно судить о качестве ФЭУ (Хлебников и др., 1962). Наклон участка кривой, соответствующего малым напряжениям питания (рис. 5.15, 1), обусловлен недостаточным усилением ФЭУ и поэтому просчетом импульсов малой амплитуды. Следующий участок 2 (режим насыщения) соответствует регистрации на выходе каждого термоэлектрона, умноженного диодной системой; некоторый наклон этого участка может быть вызван причинами, связанными с термоэмиссией диодов и развитием побочных процессов в ФЭУ (газовый разряд, автоэлектронная эмиссия), которые резко возрастают на участке 3. Следовательно, по существованию и наклону плато на графике счетной характеристики также можно судить о качестве ФЭУ. По этим характеристикам ФЭУ условно можно разделить на «хорошие» и «плохие».

У «хороших» ФЭУ преобладает термоэлектронная эмиссия, и в силу ее одноэлектронной природы, амплитуды выходных сигналов распределены по закону Пуассона (Яноши, 1955; Флейшман, 1962; Хлебников и др., 1962; Перцев и др., 1963, 1964, 1965; Артемьев, 1964; Bay a. Papp, 1964; Eberhardt, 1964; Hayman et al., 1964; Baldwin a. Friedman, 1965):

$$p_N = \frac{\bar{k}^N}{N!} e^{-\bar{k}}, \quad (5.8)$$

где $\bar{k}$ численно близко к коэффициенту вторичной эмиссии первого диода σ_1 (у «хороших» ФЭУ $\sigma_1 \geq 5$).

При меньших значениях σ_1 проявляется действие закона Пуассона на последующих диодах. Это приводит к значительному искажению первоначального распределения. Как показал Флейшман (1962), $\bar{k}$ в этом случае меньше σ_1 :

$$\bar{k} = \frac{\sigma_2(\sigma_1 - 1)}{\sigma_1}, \quad (5.9)$$

где σ_2 — средний коэффициент вторичной эмиссии диодов начиная со второго.

Поскольку величины σ_1 и σ_2 зависят от межкаскадного напряжения, то у тех ФЭУ, для которых рекомендуемое напряжение на участке фотокатод—1-й диод в 1.5—2 раза превышает следующие межкаскадные напряжения, σ_1 и σ_2 также будут различны.

В большинстве цитируемых работ изучалось также амплитудное распределение фотоэлектронных импульсов (при очень слабой подсветке фотокатода) и показано, что оно совпадает по форме с амплитудным спектром термоэлектронов (положение пика не менялось). У так называемых «плохих» ФЭУ наблюдается экспоненциальное распределение амплитуд выходных импульсов. Это может быть следствием того, что либо на выходе ФЭУ преобладали импульсы не термоэлектронной природы, либо ФЭУ исследовался в неподходящем для этих целей режиме, либо мало зна-

чение $\bar{k}$, в частности, из-за пролета фотоэлектронов мимо первого динода, что особенно вероятно для жалюзийных ФЭУ (Хлебников

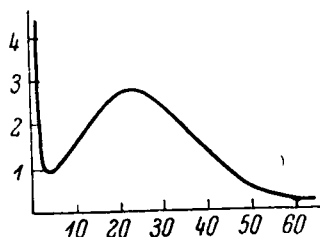


Рис. 5.16. Амплитудное распределение шумов ФЭУ-1С (Перцев и др., 1965).

По оси абсцисс — величина амплитуды (отн. ед.), по оси ординат — число импульсов.

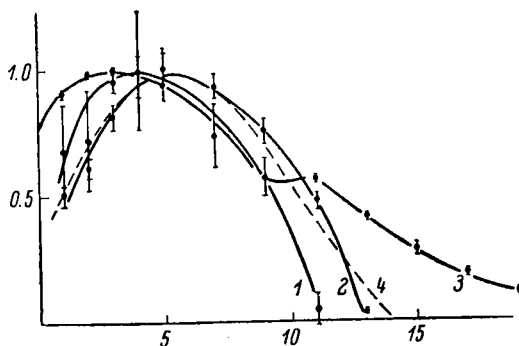


Рис. 5.17. Амплитудное распределение шумов и фотоимпульсов ФЭУ-А 1 при $\lambda=479$ мкм.

1 — шум, 2 — сигнал при $N_0=224$ имп./сек., 3 — сигнал при $N_0=6000$ имп./сек., 4 — теоретическая кривая при $k=3.2$. N_0 — скорость счета при отсутствии дискриминации. Остальные обозначения те же, что и на рис. 5.16.

и др., 1962; Перцев и др., 1964). Как известно, при $\bar{k}$, близком к единице, пуассоновское распределение имеет вид, подобный экспоненциальному.

На практике почти не встречается абсолютно «хороших» ФЭУ. Для большинства практически «хороших» ФЭУ наблюдается не чисто пуассоновское распределение амплитуд выходных сигналов, а распределение, представленное на рис. 5.16, где относительно большое число импульсов в области малых амплитуд может быть связано с термозмиссией первых динодов. При работе с такими ФЭУ хорошие результаты дает регистрация импульсов в максимуме одноэлектронного пика (с помощью дифференциального или интегрального порогового дискриминаторов). В частности, такой прием использовали Казначеев и др. (1965) и Ковалева и др. (1965) при регистрации очень слабых свечений.

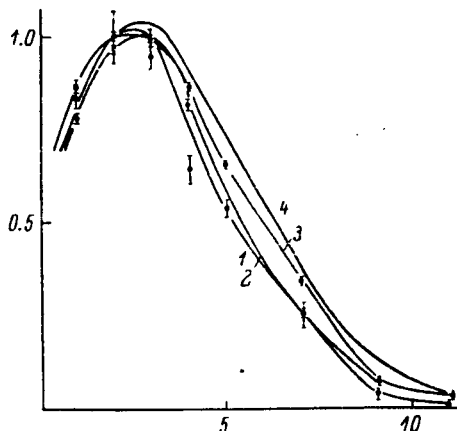


Рис. 5.18. Амплитудное распределение шумовых и фотоимпульсов ФЭУ-А 1 при $\lambda=260$ мкм.

1 — шум, 2 — сигнал при $N_0=2400$ имп./сек., 3 — сигнал при $N_0=300$ имп./сек., 4 — теоретическая кривая. Остальные обозначения те же, что и на рис. 5.16.

Наилучшим результат применения дискриминации должен быть при регистрации охлажденным фотоумножителем. Охлаждение ФЭУ приводит к уменьшению количества термоэлектронов, т. е. в первую очередь к падению одноэлектронного пика (Перцев и др., 1963, 1964), что, при правильно выбранной температуре охлаждения (см. раздел 5.3), позволит получить соответствующий выигрыш в отношении сигнал/шум.

Что касается регистрации слабых световых потоков ФЭУ с экспоненциальным распределением импульсов по амплитудам, то целесообразность введения дискриминации должна решаться путем сравнения амплитудного распределения импульсов сигнала и шума.

Таким образом, из сказанного следует, что в каждом случае применения дискриминации необходимо определять амплитудное распределение импульсов на выходе ФЭУ, чтобы судить о его качестве, и выбрать нужную амплитуду дискриминации.

Методика определения амплитудного распределения, используемая в нашей лаборатории (Новиков и Янгигаев, 1966), состоит в следующем. Первоначально при различных на-

пряжениях на ФЭУ снимают зависимость числа темновых импульсов N_t от коэффициента усиления усилителя K . Эти измерения позволяют определить коэффициент усиления K_0 , начиная с которого число регистрируемых импульсов не зависит от K .

Рис. 5.19. Амплитудное распределение фотоимпульсов охлажденного ФЭУ-А1 при 479 мк.

1 — сигнал при $N_0=1025.5$ имп./сек., 2 — сигнал при $N_0=220$ имп./сек., 3 — теоретическая кривая при $K=0.8$. Остальные обозначения те же, что и на рис. 5.16.

Зависимость $N_t=f(K)$ должна иметь вид кривой с насыщением. Значения N_t , соответствующие области насыщения, используют для построения счетной характеристики ФЭУ. Рабочее напряжение U_p выбирается на плато счетной характеристики. При отсутствии плато (или перегиба) устанавливается напряжение, рекомендуемое в паспорте ФЭУ. В обоих случаях рабочий коэффициент усиления K_p выбирается из условия $K_p \geq K_0$. Затем измеряют распределение импульсов с ФЭУ по амплитудам для выбранных U_p и K_p .

Для примера приведем некоторые результаты исследования фотоумножителя ФЭУ-А1. Счетная характеристика этого ФЭУ представлена на рис. 5.15. Видно, что при 1500—1600 в проис-

ходит полный сбор тепловых электронов, вылетающих из фотокатода; в то же время в таком режиме невелики разрядные явления. Поэтому рабочее напряжение ФЭУ было установлено 1600 в.

Амплитудное распределение шумовых импульсов и сигнала (при облучении светом с $\lambda=479$ мкм) представлено на рис. 5.17. Как видно, амплитудные распределения темновых и фотоимпульсов совпадают между собой и с теоретической кривой пуассоновского распределения при $\bar{k}=3.2$. Когда число падающих фотонов велико, появляется второй максимум, который может быть связан с образованием многоэлектронных импульсов (Артемьев, 1964). Амплитудное распределение фотоимпульсов, вызванных УФ светом ($\lambda=260$ мкм), сходно с распределением на рис. 5.17 и описывается уравнением с $\bar{k}=3$ (рис. 5.18).

Охлаждение ФЭУ до -78°C меняет форму кривой распределения фотоимпульсов по амплитудам: исчезает максимум, и распределение описывается теоретической кривой с $\bar{k}\cong 1$ (рис. 5.19). Такой эффект не согласуется с литературными данными (Перцев и др., 1963) и может быть связан с изменением режима работы или параметров ФЭУ при охлаждении (Баренбойм и др., 1966).

Из приведенных данных следует, что применение амплитудной дискриминации не даст выигрыша в отношении сигнал/шум для исследованного ФЭУ, так как амплитудные распределения сигнала и шума близки между собой.

В заключение нам еще раз хотелось бы подчеркнуть, что в этой главе рассмотрены только особенности основных элементов аппаратуры для регистрации ультрафиолетового и слабого или сверхслабого свечения.* Иллюстрацией того, как эти особенности учитываются в зависимости от назначения и специфики исследования, являются описанные в главе 6 конкретные установки.

* В понятия «слабые» и «сверхслабые» свечения различные авторы вкладывают разный смысл. Так, в работах, помещенных в сборнике «Биолюминесценция» (1965 г.), Васильев называет свечение в 20–50 фотонов/сек. слабым, а Фиш и другие — свечение в 10^3 фотонов/сек. сверхслабым. Было бы разумно измерять величину светового потока в абсолютных единицах. Однако это методически сложно, поскольку связано с абсолютной фотометрией. Гораздо проще определять категорию светового потока по отношению к параметрам ФЭУ, которым регистрируется данный световой поток. Тогда сверхслабыми можно считать такие световые потоки, регистрация которых рядовыми ФЭУ требует специальных мер для снижения шумов, т. е. $I_\phi < I_T$ (см. раздел 5.3). Если $10I_T \geq I_\phi \geq I_T$, то такие световые потоки можно считать слабыми, а если $10I_T < I_\phi$, то их можно считать сильными. Однако I_T меняется в зависимости от экземпляра и типа ФЭУ. Можно принять, что среднее значение $I_T=10^3$ имп./сек., и определять категорию светового потока, исходя из этой величины по приведенным выше критериям.

УСТАНОВКИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ БИОПОЛИМЕРОВ И КЛЕТОК

Прогресс в изучении люминесценции биополимеров и клеток самым тесным образом связан с разработкой новой аппаратуры. Поэтому в предлагаемой главе частично собран известный по литературе материал, и описана серия разработанных нами сравнительно простых установок для изучения фото-, химии и радиолюминесценции биополимеров и клеток. Эти установки позволяют проводить исследования в том объеме, в каком они были представлены в предыдущих разделах этой книги.

Наряду с конструированием установок самостоятельную сложность представляет решение многих методических вопросов техники измерений. Из-за ограниченности места эти вопросы в книге не рассмотрены. Частично, в применении к биополимерам и их составляющим, методические аспекты измерений параметров люминесценции освещаются в литературе (Teale a. Weber, 1957; Parker a. Rees, 1960; Бурштейн и Владимиров, 1964; Владимиров и Литвин, 1964; Parker, 1964).

6.1. ОБЩИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ УСТАНОВОК ДЛЯ РЕГИСТРАЦИИ ФОТОЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ

Требования к установкам

Регистрация фотолюминесценции биологических объектов предъявляет специфические требования к техническим данным и конструкции установок. Оптимальная установка должна иметь следующие качества: 1) универсальность, 2) высокую чувствительность к слабым и сверхслабым световым потокам, 3) широкий диапазон измерений, 4) стабильность.

При изучении миграции энергии в белке, например, необходимо знать спектры возбуждения, свечения и величину деполяризации (Weber, 1960); при измерении эффективности синглет-триплетного перехода в белках и аминокислотах под влиянием кислорода изучают спектры флуоресценции, фосфоресценции, время затухания фосфоресценции (Баренбойм, 1963). Поэтому

при подобных (и многих других) измерениях необходимым качеством установки является ее универсальность, под которой понимается способность установки зарегистрировать на одном и том же образце с незначительным временным интервалом ряд основных характеристик люминесценции (спектры возбуждения и излучения флуоресценции и фосфоресценции, их поляризации и времена жизни).

Необходимость в высокой чувствительности, достигающей до способности считать отдельные фотоны, обусловлена рядом причин: 1) малым квантовым выходом ряда веществ (квантовый выход тимины, например, не превышает в оптимальных условиях 0.015; Udenfriend и Zaltzman, 1962); 2) быстрой фотохимической деструкцией биополимеров или взвесей живых клеток, что ставит предел возможному увеличению интенсивности возбуждающего света; интенсивность флуоресценции взвеси митохондрий, например, уменьшается вдвое за одну минуту при возбуждении сравнительно слабым потоком лампы СВД-120А в условиях, описанных в работе Баренбойма, Пинто и Правдиной (1963); 3) трудностью получения многих биологически важных веществ в больших количествах, что приводит к необходимости работать иногда с практически ничтожными объемами и концентрациями таких веществ.

Широкий диапазон измерений также является необходимым условием работы. Если у триптофаносодержащих белков квантовый выход может достигать 10—15% (Бурштейн, 1961), то у некоторых белков, основным хромофором которых является тирозиновый остаток, величина его не превышает долей процента (Weber, 1961). В широких пределах изменяется квантовый выход в кинетических экспериментах: так, при понижении рН среды интегральная интенсивность флуоресценции ДНК возрастает на два-три порядка по сравнению с несколькими десятками фотонов в секунду при нейтральных рН, как это было показано Баренбоймом, Доманским и Правдиной (1963).

Высокая стабильность установки особенно важна потому, что люминесцентные характеристики биологических объектов имеют значительный разброс в силу большой неоднородности самих объектов и изменчивости их состояния, обусловленной значительной неоднородностью среды, которую практически трудно контролировать. Это приводит к необходимости проводить большое число экспериментов для получения статистически достоверного результата.

Кроме того, желательно, чтобы установки для регистрации фотолюминесценции биологических объектов имели автоматическую запись скорректированных спектров излучения и действия с достаточно большими скоростями; чтобы они позволяли легкий и быстрый переход между измерениями различных характеристик, имели термостабилизированные кюветы и т. д. Наконец, простота и дешевизна установки являются ее немаловажным достоинством.

*Некоторые особенности установок
для регистрации фотолюминесценции*

Рассмотрим приемы, используемые при конструировании ряда установок для выполнения перечисленных выше требований.

Для коррекции спектров возбуждения люминесценции во многих установках используют принцип деления двух сигналов, который легко понять на примере установки, описанной Паркером (Parker, 1958).

В установке используются два ФЭУ, на один из которых попадает свет люминесценции исследуемого объекта, а на другой кварцевой пластинкой отражается часть возбуждающего света. Величина сигнала A_1 с ФЭУ, регистрирующего люминесценцию объекта, будет определяться интенсивностью возбуждающего монохроматического света S , зависимостью фототока ФЭУ от напряжения питания $f_1(U)$ и интенсивностью люминесценции объекта I , т. е.

$$A_1 = K_1 \cdot S \cdot I \cdot f_1(U), \quad (6.1)$$

где K_1 — некоторая константа.

Величина контрольного сигнала определяется интенсивностью возбуждающего света S , зависимостью фототока ФЭУ от напряжения питания $f_2(U)$ и спектральной чувствительностью ФЭУ $f(\lambda)$, т. е.

$$A_2 = K_2 \cdot S \cdot f_2(U) \cdot f(\lambda). \quad (6.2)$$

Поделив один сигнал на другой, получим

$$\frac{A_1}{A_2} = \frac{K_1}{K_2} \cdot \frac{f_1(U)}{f_2(U)} \cdot \frac{1}{f(\lambda)} \cdot I. \quad (6.3)$$

Из формулы (6.3) следует, что если пользоваться ФЭУ с одинаковыми параметрами [$f_1(U) = f_2(U)$] и исключить влияние $f(\lambda)$ (что обычно достигается путем помещения перед ФЭУ люминесцирующего с постоянным энергетическим выходом экрана; см. стр. 156), то отношение сигналов будет линейно связано с изменением интенсивности люминесценции объекта в зависимости от длины волны возбуждающего света. Деление сигналов можно осуществить электромеханически с помощью электронного автоматического потенциометра (Мекшенков и Андрейцев, 1960).*

Принцип деления широко используется, что можно проиллюстрировать рядом примеров.

* Некоторые авторы (Eisenberg et al., 1962) используют контрольный сигнал для автоматической регулировки усиления в усилителе полезного сигнала, другие (Чечик и др., 1957; Борисов и Мохова, 1964) — для регулирования усиления ФЭУ путем подачи контрольного сигнала на управляющую сетку лампы, включенной последовательно с источником питания ФЭУ.

Среди относительно несложных установок можно назвать универсальный регистрирующий прибор (Мекшенков и Андрейцев, 1961), двухлучевой спектрофлуориметр (Melhuish a. Murashige, 1962) и спектрофлуорофосфориметр (Haugen a. Marcus, 1964).

Айнсворт и Винтер (Ainsworth a. Winter, 1964) разработали установку, автоматически записывающую степень поляризации флуоресценции как функцию длины волны возбуждающего света, и спектры поглощения, возбуждения и флуоресценции, скорректированные путем использования схемы деления.

Еще более совершенный прибор описали Розен и Эдельман (Rosen a. Edelman, 1965). Это стабильный спектрофлуориметр, позволяющий записывать скорректированные спектры возбуждения и излучения флуоресценции и фосфоресценции и аналогичные характеристики в поляризованном свете как функцию температуры и рН объекта.

Все перечисленные выше установки не приспособлены для регистрации сверхслабых свечений, так как порог чувствительности их ограничен шумами ФЭУ при комнатной температуре. Универсальность и высокая чувствительность соединены в установке, состоящей из приставки-фосфороскопа и спектрофотометра СФ-4, которая разработана в Лаборатории биофизики и изотопов АН БССР (Катибников и Конев, 1961; Бобрович и др., 1965). Установка позволяет измерять спектры флуоресценции, действия и степень их поляризации при комнатной и низкой температуре и получать аналогичные спектральные характеристики фосфоресценции с временем жизни до 10^{-3} сек. Однако в установке нет приспособлений, исключающих колебание яркости источника света, а полученные спектры требуют введения поправок на спектральную чувствительность ФЭУ и дисперсию монохроматора, т. е. отсутствуют те достоинства, которые присущи описанным выше установкам. Высокочувствительный прибор, позволяющий записывать спектры некоторых биополимеров, описан Ковалевой и др. (1965). Для возбуждения люминесценции и определения ее спектрального состава используются монохроматоры ДМР-4. Специальное реверсивное пересчетное устройство позволяет автоматически вычитать шумовые импульсы из полезного сигнала. Однако отсутствие универсальности, стабильности и автоматической коррекции спектров характерно и для этой установки.

Отметим, что наряду с приведенными выше автоматическими и чувствительными, относительно сложными установками существует ряд простых спектрофлуориметров, выполненных на базе спектрофотометра Весман (Bowman et al., 1955; Gemiel, 1956; Sprince et al., 1957; Cowgill, 1963) или СФ-4 (Владимиров и Бурштейн, 1960; Владимиров и Литвин, 1964).

Таким образом, ни одна из упомянутых установок не удовлетворяет одновременно всем тем требованиям, которые были указаны в начале параграфа, хотя в некоторых случаях это оправ-

дано, тем, что установка предназначена для узких целей. Из этого короткого обзора также следует, что в настоящее время довольно широко используется схема деления как метод стабилизации и коррекции, и схема счета импульсов малощумящим ФЭУ как метод повышения чувствительности. Универсальная установка, сочетающая эти обе схемы, в значительной степени соответствовала бы названным требованиям. Такая «гибридизация» была осуществлена нами (Баренбойм и др., 1964, 1966; Доманский и др., 1966) в установке, описываемой ниже.

6.2. ФОТОЭЛЕКТРИЧЕСКАЯ УНИВЕРСАЛЬНАЯ УСТАНОВКА

Установка предназначена для регистрации спектров флуоресценции, фосфоресценции, поглощения и возбуждения и степени их поляризации в видимой и ультрафиолетовой областях спектра и в широком диапазоне интенсивностей (рис. 6.1).

Б л о к - с х е м а. Свет от источника непрерывного спектра 2 (рис. 6.2, а) проходит через диафрагму 3, конденсор 4 и двойной монохроматор ДМР-2 6, а затем линзами 7 и 11 фокусируется на переднюю плоскость кюветы 12 с объектом. Часть света (4%) отражается кварцевой пластинкой 8 на урановое стекло, за которым помещен ФЭУ опорной цепи.

Свет люминесценции собирается линзами 16 и 19, проходит через монохроматор ЗМР-3 20 и фокусируется на катode ФЭУ 22. При необходимости в карманах камеры 14 устанавливаются оптические фильтры. При измерении спектра фосфоресценции (рис. 6.2, б) возбуждающий свет попадает на объект 26 через отверстие в барабане фосфороскопа 24 и оптический вход сосуда Дьюара 25. Свет фосфоресценции собирается линзами 16 и 19 на щель монохроматора ЗМР-3, проходя через оптический вход кварцевого Дьюара и отверстие в барабане фосфороскопа. При измерении спектров поглощения кювета с объектом 12 разворачивается перпендикулярно падающему свету; проходящий свет регистрируется вторым ФЭУ. Для регистрации поляризованных спектров в световой поток вводятся поляроиды 10, 15 и 17. Поляроиды могут устанавливаться в двух фиксированных, взаимно перпендикулярных положениях.

Световой поток регистрируется фотоэлектронным умножителем. Сигнал с ФЭУ 22 после усиления (усилитель УШ-2 или «Кактус») делится на сигнал с опорного ФЭУ 9. Результат деления регистрируется электронным автоматическим потенциометром ЭПП-09М2.

Рассмотрим более подробно некоторые элементы установки.

О п т и к о - м е х а н и ч е с к а я ч а с т ь . Система линз обеспечивает достаточно эффективный сбор света. Линзы изготов-

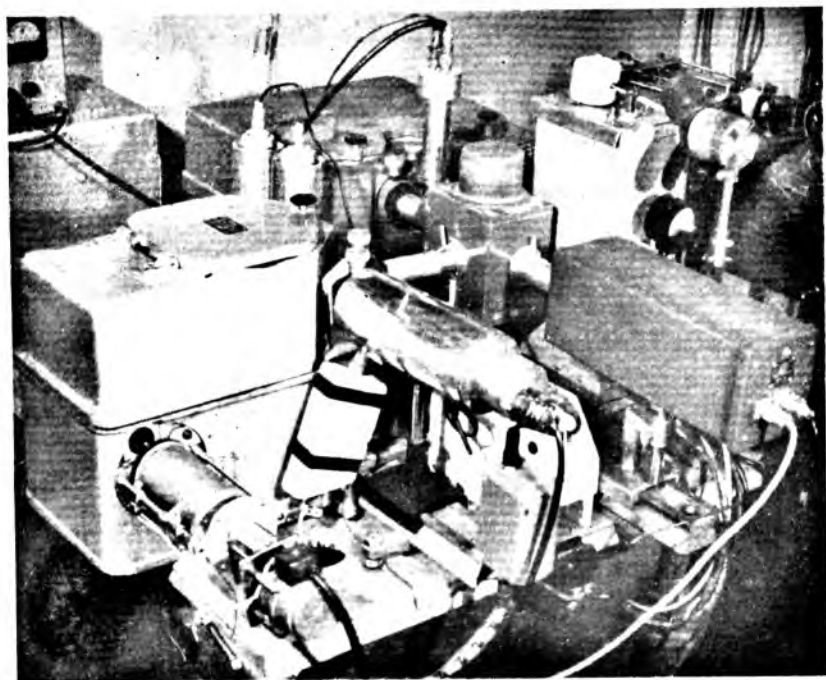


Рис. 6.1. Оптико-механическая часть универсальной фотоэлектрической установки.

Вращение призм обоих монохроматоров производится реверсивными электромоторами через редуктор, уменьшающий число

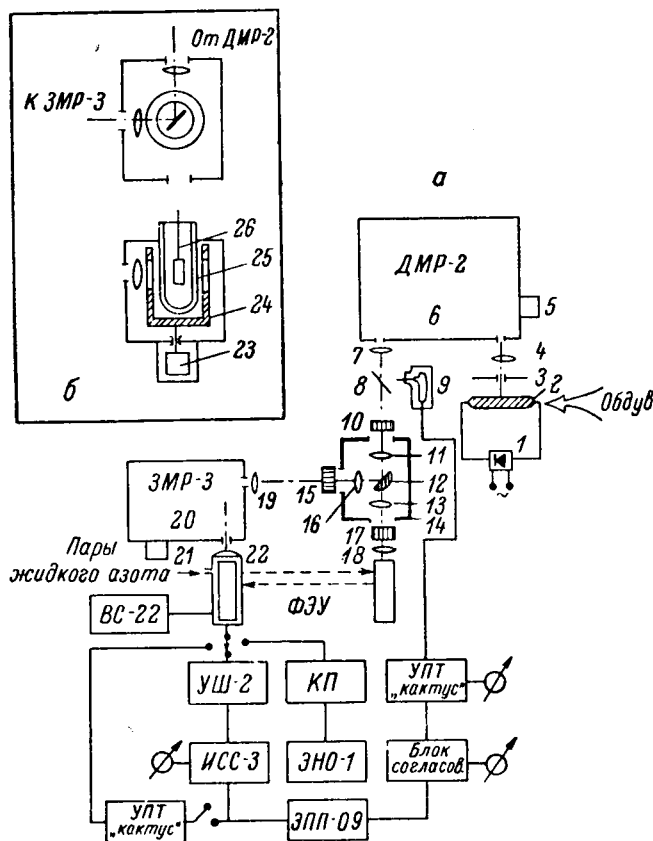


Рис. 6.2. Блок-схема универсальной установки (а) и приспособления для низкотемпературных измерений (б).

1 — источник питания лампы, 2 — лампа, 3 — диафрагма, 4 — конденсор, 5 и 21 — двигатели РД-09, 6 — монохроматор ДМР-2, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 — оптические линзы, 16 — защитная пластинка, 17 — ФЭУ опорной цепи, 18, 19, 20, 21 — фотоэлектронный умножитель, 22 — ФЭУ опорной цепи, 23 — фотоэлектронный умножитель, 24 — светонепроницаемая камера, 25 — монохроматор ЗМР-3, 26 — охлаждаемый ФЭУ, 27 — мотор ДВА-У4, 28 — барабан флюороскопа, 29 — кварцевый сосуд Дьюара, 30 — держатель образцов.

оборотов. При максимальной скорости вращения призм спектр флуоресценции в области 300—400 мкм записывается за 32 сек. Кроме того, возможно простое замедление скорости в 4, 16 и 64 раза. Отметка длин волн производится автоматически на ленте

самописца ЭПИ-09. Предусмотрена автоматическая остановка вращения призмы после прохождения заданного интервала длин волн.

Для измерения степени и спектра поляризации в установке использованы поляроиды. Конструкция крепления поляроидов (рис. 6.3) обеспечивает их поворот на 90° с фиксацией и надежной изоляцией от внешнего света. Поляроидная пленка крепится в обойме, которая вставляется в держатель 2 и определенным образом ориентируется по отношению к нему. Затем эта система помещается в прорезь тубуса 5, закрывается крышкой 3 и уплотняется скользящей накатной гайкой 4. Поляроиды, помещенные в специальные оправы, могут быть легко убраны, если это требуется условиями измерений, или заменены на другие, в зависимости от требуемого спектрального интервала.

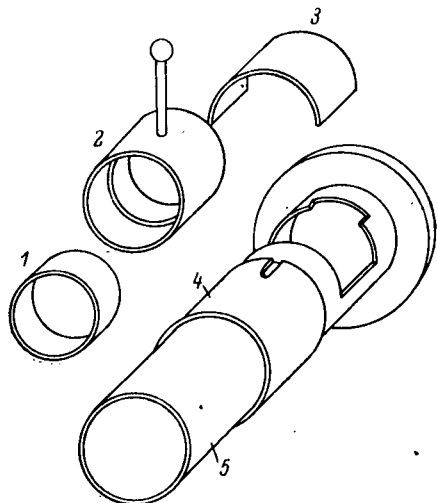


Рис. 6.3. Приспособление для крепления поляроидов.

1 — фиксирующее кольцо, 2 — держатель поляроида, 3 — крышка тубуса, 4 — скользящая гайка, 5 — тубус.

Универсальные термостабилизированные кюветы выполнены в двух вариантах. Первый вариант (рис. 6.4, а) позволяет регистрировать параметры флуоресценции и поглощения. Кювета 1 из набора к спектрофотометру СФ-4 помещается в металлический держатель 3, внутри которого через штуцеры 1 осуществляется циркуляция воды. Держатель может поворачиваться относительно

но станины 4, занимая два фиксированных положения: перпендикулярно световому потоку и под углом 30° .

Второй вариант кюветы (рис. 6.4, б) используется при необходимости быстро сравнить несколько образцов между собой. Для этого в четыре полуцилиндрические прорези 2, закрытые кварцевыми стеклами 3 и крышками с окнами 4, помещаются растворы. Термостабилизация осуществляется циркуляцией воды, подаваемой через штуцеры 1 в отверстия корпуса кюветы 5. Корпус может поворачиваться относительно станины 6 и занимать четыре фиксированных положения (8 — фиксатор). Обе кюветы крепятся стойками 7 ко дну камеры.

Источники возбуждения. В установке предусмотрены сменные источники света для возбуждения люминесценции. Для измерения спектров поглощения, возбуждения и, в некоторых случаях, спектров люминесценции используются мощные

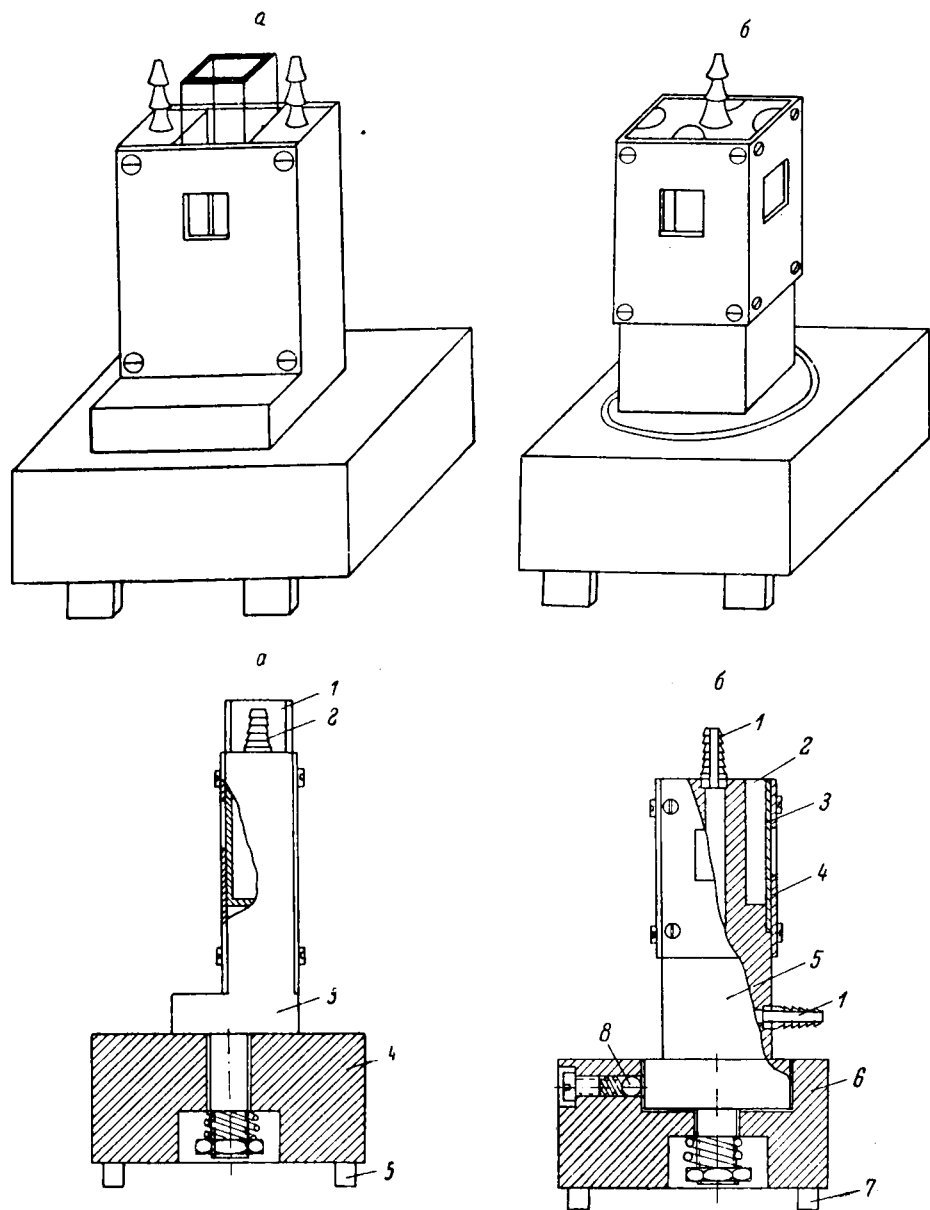


Рис. 6.4. Термостабилизированные кюветы (общий вид и схема).

a — для регистрации флуоресценции и поглощения: 1 — кварцевая кювета спектрофотометра СФ-4, 2 — штутер, 3 — корпус кюветы, 4 — станина, 5 — ножки для крепления кюветы внутри камеры. *б* — для сравнительного исследования флуоресцентных характеристик нескольких образцов: 1 — штутер, 2 — прорезь для помещения раствора, 3 — кварцевое стекло, 4 — прижимная планка, 5 — корпус кюветы, 6 — станина, 7 — ножки для крепления кюветы внутри камеры, 8 — фиксатор.

лампы с непрерывным спектром типа ДКсШ-200 и ДКсШ-1000. Эти лампы помещаются в специальный металлический кожух, который снабжен механическими устройствами для юстировки лампы перед входной щелью монохроматора. При регистрации спектров люминесценции также применяется ртутная лампа СВД-120А.

В большинстве случаев флюоресценцию исследуют с помощью флюороскопа, применяя при этом непрерывное возбуждение от лампы, свет которой прерывается диском или барабаном флю-

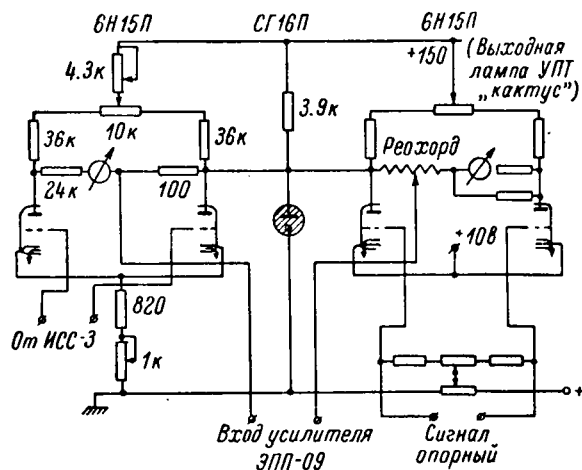


Рис. 6.5. Принципиальная схема блока согласования.

флюороскопа. При исследовании биополимеров и клеток разумно в некоторых случаях применять однократное возбуждение, так как остро выраженные спектры флюоресценции этих объектов быстро меняют свою форму и интенсивность вследствие фотоллиза. Принцип однократного возбуждения используется реже и технически разработан мало (Кисляк, 1958; Пилипович и Свешников, 1958; Каминский, 1959). В описываемой установке для разового возбуждения флюоресценции применяется лампа ДРШ-500, работающая в импульсном режиме (см. раздел 5.1).

Электрическая схема. Основными особенностями электрической схемы описываемой установки являются высокая чувствительность, работа в двух режимах (счет импульсов и регистрация постоянного тока) и деление основного сигнала на опорный, что повышает стабильность регистрации и позволяет получить ряд характеристик без дополнительных поправок.

Измерения всех люминесцентных характеристик производятся с помощью ФЭУ-39, охлаждаемого парами жидкого азота до тем-

пературы, оптимальной для данного светового потока, но не ниже -150°C (Баренбойм и др., 1966а). Спектры поглощения измеряются с помощью ФЭУ-57, который имеет максимум спектральной чувствительности при 280 мкм. Сигнал с ФЭУ поступает на схему деления.

Схема деления может работать в двух режимах: в режиме измерения постоянного тока и в режиме счета импульсов с ФЭУ.

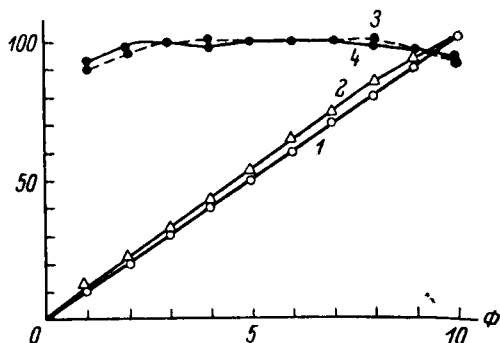


Рис. 6.6. Характеристики схемы деления.

По оси абсцисс — световой поток (усл. ед.), по оси ординат — отсчет регистрирующих приборов (усл. ед.). 1 — сигнал в опорном канале (отсчет по УПТ «Кактус»); 2 — сигнал в канале измерения (отсчет по прибору ИСС-3); 3 — расчетная кривая, полученная посредством деления значений сигнала в канале измерения (кривая 2) и сигнала в опорном канале (кривая 1); 4 — показания, снимаемые с потенциометра ЭПП-09М2.

При работе в режиме усиления постоянного тока измеряемый сигнал поступает на вход электрометрического усилителя типа «Кактус» и с него — на автоматический потенциометр ЭПП-09. При работе в режиме счета отдельных импульсов сигнал усиливается широкополосным усилителем «Сирень», интегрируется прибором ИСС-3, затем поступает в блок согласования, связывающий каналы регистрации свечения и опорного сигнала, и оттуда — на ЭПП-09. Опорный канал в обоих случаях состоит из ФЭУ-39 и усилителя «Кактус» с выходом на самописец ЭПП-09.

Вся схема регистрации и деления выполнена на типовых приборах «Кактус», «Сирень», ИСС-3, ЭПП-09М2. Дополнительным является простой электронный блок согласования, схема которого приведена на рис. 6.5. Этот блок собран прямо на шасси усилителя «Кактус» и питается непосредственно от схемы «Кактуса».

Рис. 6.6 и 6.7 иллюстрируют работу схемы деления. Видно, что погрешности в делении лежат в области малых сигналов. Это определяется наличием нестабильности в опорных цепях усилителей постоянного тока, которые возникают при подклю-

нии обоих усилителей (опорного и сигнального) к самописцу ЭПП-09М2.

При регистрации времени жизни флуоресценции методом однократного возбуждения сигнал с фотоумножителя после катодного повторителя поступает на вход низкочастотного осциллографа ЭНО-1, имеющего экран с послесвечением. Время жизни определяется фотографически или визуально как время, соответствующее падению ин-

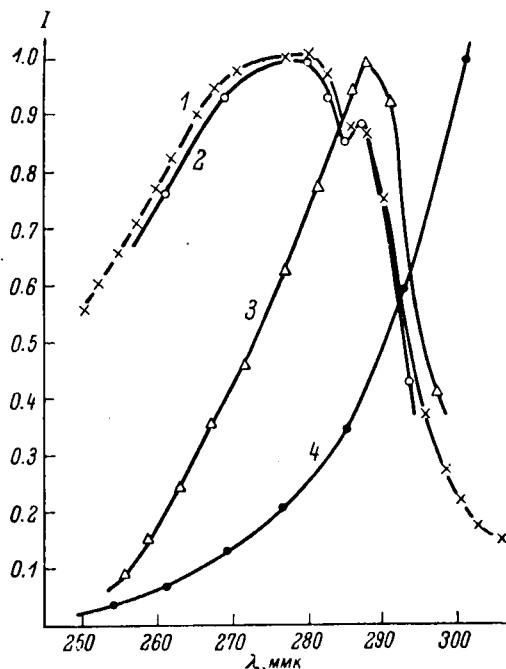


Рис. 6.7. Коррекция спектров возбуждения схемой деления.

1 — спектр поглощения триптофана, 2 — спектр возбуждения люминесценции триптофана, полученный со схемой деления, 3 — спектр возбуждения, полученный без применения схемы деления, 4 — спектр источника возбуждающего света.

тенсивности флуоресценции в e раз. Для точного определения времени жизни важно иметь точку начала затухания флуоресценции в одном и том же месте экрана осциллографа. Это позволяет делать приспособление, схема которого дана на рис. 6.8. К экрану осциллографа 6 монтируется фотосопротивление 7, управляющее вспышкой лампы 1. Когда светящаяся точка, связанная с перемещением электронного луча по экрану осциллографа, доходит до фотосопротивления, срабатывает схема, замыкающая контакты пусковой кнопки импульсной лампы.

Упрощенный вариант спектрофлуориметра

Этот вариант может представить интерес, так как при его создании использованы только серийно выпускаемые блоки, не требующие дополнительной настройки и сколько-нибудь серьезной переделки.

Б л о к - с х е м а. Источником света служит осветитель ОИ-18 1 (рис. 6.9), питаемый от сети через феррорезонансный стабилизатор 2. Возбуждающий свет выделяется комбинацией светофилт-

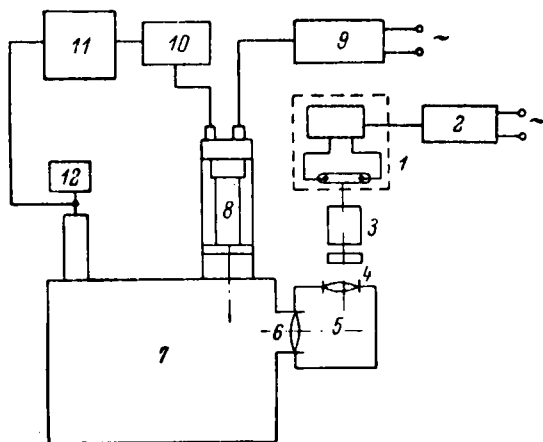


Рис. 6.9. Блок-схема простого спектрофлуориметра.

1 — осветитель ОИ-18, 2 — стабилизатор СН-500, 3 — светофильтры, 4 и 6 — линзы, 5 — исследуемый объект, 7 — монохроматор ЗМР-3, 8 — фотоэлектронный умножитель, 9 — высоковольтный источник, 10 — усилитель постоянного тока, 11 — потенциометр ЭПП-09, 12 — электромотор СРД-2.

ров 3: газового хлор-бромного и УФС-1. Вместо газового фильтра может быть использован более доступный жидкостный (см. раздел 5.3). Линзой 4 возбуждающий свет фокусируется на кварцевую пробирку с исследуемым объектом 5. Пробирка устанавливается в эбонитовой светонепроницаемой камере, сочлененной с монохроматором ЗМР-3 7 и осветителем. Свет люминесценции собирается линзой 6 на входную щель монохроматора и, разложенный в спектр, попадает на фотоумножитель ФЭУ-39 8. ФЭУ питается от стабилизированного источника типа «Орех» 9 и помещен в гильзу, входящую в комплект источника питания. Регистрация сигнала с ФЭУ осуществляется усилителем постоянного тока микрорентгенометра «Кактус» 10 с последующей фиксацией на ленте автоматического потенциометра ЭПП-09 11. Электромотор СРД-2 12, вращающий призму монохроматора, одновременно при каждом обороте разряжает на вход автоматического потенциометра ЭПП-09

емкость (0.1 мкф), при этом на ленте пишутся «всплески», служащие реперными линиями. Вместо комбинации «Кактус»—ЭПП-09 можно пользоваться автоматическим потенциометром с высокоомным входом типа ЭППВ-60.

Усовершенствованный вариант спектрофлуориметра

В отличие от простого усовершенствованный вариант установки позволяет работать со слабосветящимися объектами при комнатной и низких температурах. Блок-схема установки не отличается в принципе от приведенной на рис. 6.9, но в некоторые узлы внесены существенные изменения.

В о з б у ж д е н и е л ю м и н е с ц е н ц и и. Источником света служит осветитель ОИ-18, но свет лампы СВД-120 стабилизирован по яркости схемой с обратной оптической связью (см. раздел 5.1) в той части спектра, которая используется для возбуждения люминесценции.

Р е г и с т р а ц и я. Так как в данной установке не предусмотрены специальные меры для снижения шумов ФЭУ, то для повышения чувствительности применен метод избирательного усиления модулированного полезного сигнала. Для этого напряжение на одном из диодов ФЭУ-39 модулируется по схеме, предложенной Борисовым (1960). Затем переменная составляющая сигнала усиливается избирательным усилителем, детектируется синхронным детектором и попадает на вход автоматического потенциометра ЭПП-09. Такая система позволяет регистрировать полезный сигнал на выходе ФЭУ начиная с 10^{-11} а без приме-

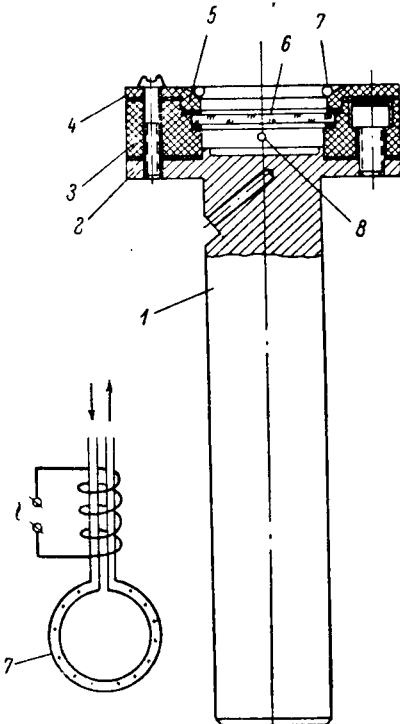


Рис. 6.10. Кювета для низкотемпературных измерений.

1 — холодопровод, 2 и 5 — прокладки, 3 — текстильный вкладыш, 4 — прижимная крышка, 6 — стекло, 7 — кольцо с отверстиями и подогревателем для обдува верхнего стекла, 8 — вводы для газа.

Н и з к о т е м п е р а т у р н ы е и з м е р е н и я. Объект помещают в специальную герметическую кювету с холодопроводом и термопарой, измеряющей непосредственно температуру исследу-

емого вещества (рис. 6.10). Для предотвращения запотевания верхнее стекло кюветы обдувают горячим воздухом из кольцевого распределителя, расположенного по периметру стекла. Этот способ оказался наиболее эффективным по сравнению с обдувом верхнего стекла сухим и холодным воздухом, протиркой спиртом и подогревом верхнего стекла. Конструкция кюветы предусматривает возможность откачки воздуха или создания избыточного давления в 0.5 атм.

6.4. УСТАНОВКА ДЛЯ ИЗМЕРЕНИЯ ИНТЕНСИВНОСТИ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ МИКРОСТРУКТУР БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ

Люминесценцию клеток в принципе можно изучать на обычных установках, подобных описанным выше, если регистрировать суммарное свечение взвеси клеток. Однако для биологии представляет большой интерес изучение люминесценции изолированных клеток и наиболее крупных ее микроструктур — ядер и митохондрий. Изучение люминесценции изолированной клетки позволяет выявить тонкие эффекты, которые могут быть замаскированы при наблюдении взвеси, позволяет связать свечение с физиологическим состоянием клетки и дает возможность локализовать структурные центры свечения в клетке. Понятно, что изолированные клетки следует изучать с помощью микроскопа. Создание серий специальных микроскопов для регистрации ультрафиолетовой флуоресценции клеток стало возможным после создания Е. М. Брумбергом опак-иллюминатора — специального технического устройства, позволившего возбуждать и регистрировать флуоресценцию клетки через один объектив. Требования к таким микроскопам слишком обширны и узко специальные, чтобы было можно здесь их обсуждать. Они включают особое требование к системе освещения, диаметру светового зонда, к конденсорам и объективам и т. д. Отметим только, что в то время как фотоэлектроника решительно вытеснила фотографические методы регистрации в люминесцентном анализе биополимеров, фотографическая регистрация, позволяющая связать свечение клетки с ее морфологическими особенностями, непременно используется в УФ люминесцентных микроскопах. В ряде случаев наряду с этим применяются электронно-оптические преобразователи.

В настоящее время созданы УФ флуоресцентные микроскопы только с фотографической регистрацией (Брумберг и Барский, 1961), дополненные фотоэлектроникой для измерения интенсивности свечения (Баренбойм и др., 1962) и ряд микроскопов-спектрофлуориметров, позволяющих записывать УФ спектры флуоресценции клеток (Агроскин и Королев, 1961; Агроскин и др., 1964; Максимовский, 1964; Ягунов и Прокофьев, 1966).

Для количественных измерений интенсивности флуоресцен-

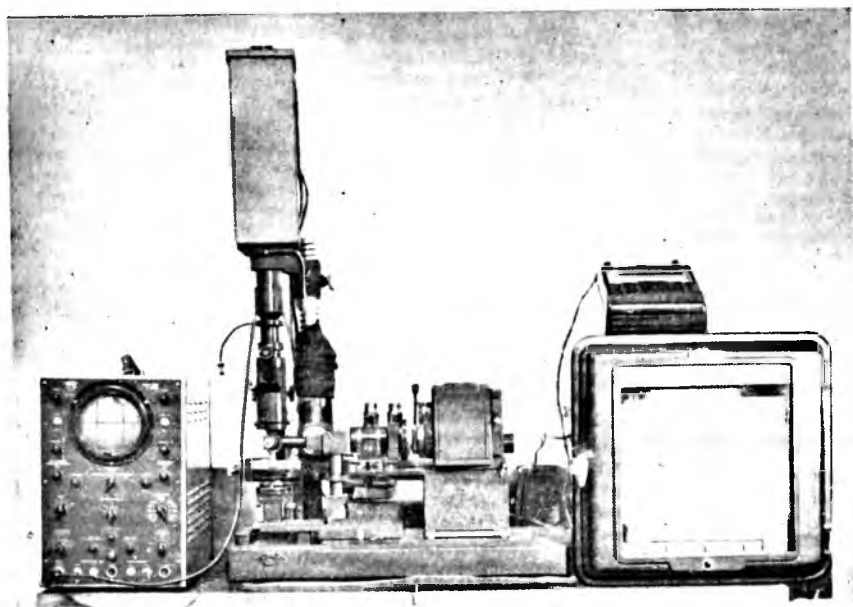


Рис. 6.11. Общий вид установки для измерения интенсивности флуоресценции микроструктур биологических объектов

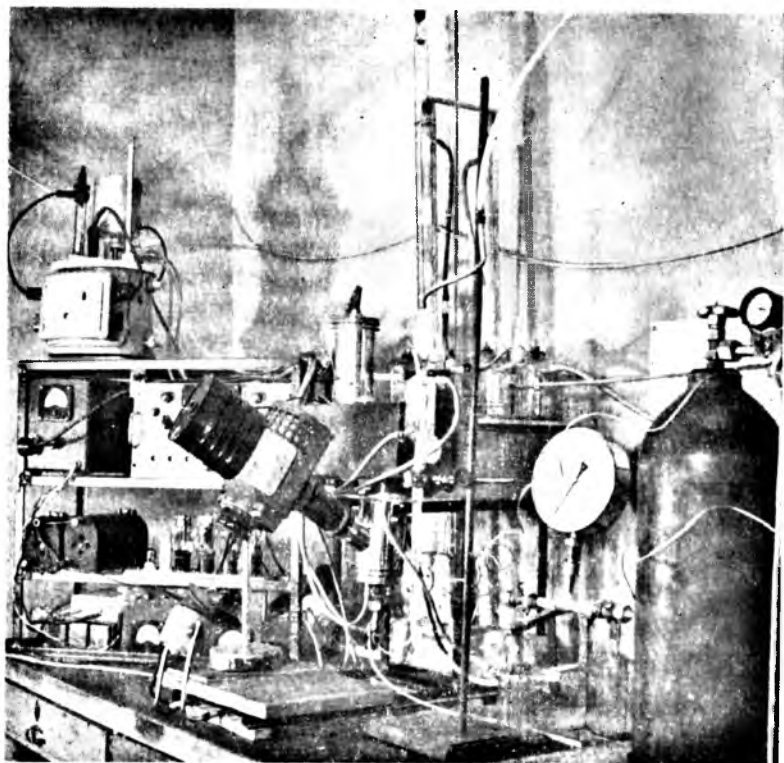


Рис. 6.13. Общий вид установки для изучения радиолуминесценции.

ции микроструктур биологических объектов одним из авторов настоящей книги совместно с И. Я. Барским и Р. И. Пинто, при постоянной консультации Е. М. Брумберга, была собрана простая установка (рис. 6.11). Эта установка позволяет измерять интенсивность флуоресценций тканей, отдельных клеток, изолированных ядер и других клеточных органоидов, изучать на основании фотографии локализацию свечения в клетке, наконец, вести наблюдения за изменением интенсивности флуоресценции пре-

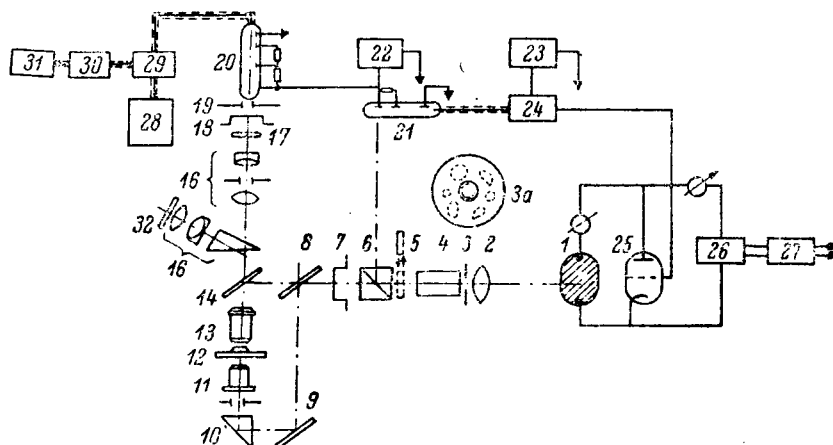


Рис. 6.12. Блок-схема установки для измерения интенсивности флуоресценции микроструктур биологических объектов.

1 — источник света, 2 — коллектор, 3 — пластинка из оргстекла с отверстием посредине (3а — поле зрения при введенной пластинке 3: видны все клетки, но люминесцируют находящиеся против отверстия в пластинке), 4, 5, 17, 32 — светофильтры, 6 — кубик с прозрачной кварцевой пластинкой, 7, 18 — фотозатворы, 8—11 — система нижнего освещения препарата, 12 — препарат, 13 — объектив микроскопа, 14 — opak-иллюминатор, 15 — система для визуального наблюдения препарата, 16 — окуляр микроскопа, 19 — диафрагма, 20 и 21 — ФЭУ, 22 — блок питания ФЭУ, 23 — блок питания усилителя, 24 — усилитель стабилизатора, 25 — триоды 6Н5, шунтирующие лампу, 26 — выпрямитель, 27 — электромагнитный стабилизатор, 28 — осциллограф 29, 30 — усилитель, 31 — автоматический потенциометр.

парата во времени. Установка была создана на основе прибора для УФ флуоресцентной микроскопии с фотографической регистрацией, который был разработан и описан Брумбергом и Барским (1961).

Б л о к - с х е м а. Установка состоит из УФ флуоресцентного микроскопа, к которому пристроено фотометрическое устройство с фотоэлектронным умножителем (рис. 6.12). Источник света — кварцевая ртутная лампа 1, световой поток которой стабилизирован непосредственно в области, вызывающей флуоресценцию клетки (см. раздел 5.1). Свет лампы через кварцевый коллектор 2, светофильтр 4 и фотозатвор 7 попадает на opak-иллюминатор 14. После отражения от светоделительного зеркала opak-иллюминатора лучи объективом микроскопа собираются на препарате

и возбуждают его флуоресценцию. Объектив 13 и окуляр 16 микроскопа дают изображение препарата в лучах его флуоресценции в плоскости катода фотоумножителя 20.

Оптическая схема. Опак-иллюминатор предложен Е. М. Брумбергом (1955). В описываемом микроскопе opak-иллюминатор имеет два сменных светоделительных интерференционных зеркал. Первый светоделитель хорошо отражает (до 90%) коротковолновые ультрафиолетовые лучи с длиной волны 250—280 мкм и пропускает лучи с длиной волны более 300 мкм. Этот светоделитель используется при возбуждении и фотоэлектрической регистрации ультрафиолетовой флуоресценции клеток. Вторым светоделитель обладает высоким коэффициентом отражения в области 360—420 мкм и хорошо пропускает лучи с длиной волны 500 мкм. Этот светоделитель используется для наблюдения клеток в свете их видимой флуоресценции, обусловленной флуорохромом. Препараты можно также наблюдать в проходящих видимых лучах источника света при затянутой диафрагме или косом освещении. Для этого в микроскопе имеется система нижнего освещения препарата. В осветительной части микроскопа помещаются сменные светофильтры 4 и 5 (рис. 6.12), выделяющие лучи определенных участков спектра для возбуждения флуоресценции препарата, а перед катодом фотоумножителя — строго скрещенные с ними светофильтры 17, выделяющие соответствующие спектральные участки в свете флуоресценции препарата.

Для выделения лучей, возбуждающих ультрафиолетовую флуоресценцию клеток, используется газовый хлор-бромный светофильтр и фильтр УФС-1. За ним расположен тепловой фильтр (кварцевая кювета толщиной 15 мм, наполненная дистиллированной водой). Перед фотокатодом находится светофильтр, состоящий из двух стекол БС-1 и УФС-2, который целиком поглощает возбуждающие флуоресценцию лучи и хорошо пропускает УФ флуоресценцию препарата. Сразу же за полевой диафрагмой осветителя помещена пластинка 3 из органического стекла с небольшим круглым отверстием посредине. Это отверстие объективом микроскопа резко изображается в плоскости объекта, в центре поля зрения микроскопа. Пластинка позволяет видеть все поле зрения, но при этом вызывать флуоресценцию только той клетки, которая приведена к проекции отверстия.

Перед фотокатодом ФЭУ в плоскость изображения клеток помещается диафрагма с малым отверстием посредине для устранения действия рассеянного света.

Электрическая схема. Сигнал с ФЭУ поступает на электрометрический выносной блок усилителя постоянного тока микрорентгенометра «Кактус» 29 (рис. 6.12), а затем на основной блок усилителя 30, на выходе которого включен автоматический самопишущий одноточечный потенциометр ЭПП-09 31. Общее время регистрации сигнала при этом не больше 1 сек.

В тех случаях, когда возбуждение длится менее 0.1 сек., для регистрации используется осциллограф ЭНО-1 28.

Для проверки стабильности работы всей установки используется флуоритовая, активированная церием пластинка, которая находится в опак-иллюминаторе 14. Она служит эталонным источником интенсивности флуоресценции. Спектры поглощения и излучения такой пластинки близки к соответствующим спектрам биологических объектов, что позволяет пользоваться эталонной пластинкой без замены светофильтра в оптической схеме прибора. Флуоресценция цериевого стекла регистрируется точно так же, как флуоресценция клетки. Изменение величины сигнала дает основание судить о нестабильности работы всей установки в целом. Кроме того, при большой электрической и оптической нестабильности в качестве определяемой величины может быть взято отношение интенсивностей флуоресценции клетки и цериевой пластинки. Таким образом, в приборе имеется возможность сравнивать между собой интенсивности флуоресценции различных клеток в препарате и в разных препаратах вне зависимости от абсолютной интенсивности излучения, возбуждающего флуоресценцию.

Установку можно использовать также для фотографирования УФ флуоресценции биологических объектов, для чего под гильзой с ФЭУ помещается фотокассета.

6.5. УСТАНОВКА ДЛЯ РЕГИСТРАЦИИ РАДИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ

Установка для регистрации радиолюминесценции должна обладать теми же качествами, что и для фотолюминесценции. Однако характер возбуждающего излучения (α - и β -частицы, гамма- и рентгеновские кванты) создает дополнительные требования. Так, при измерении параметров рентгенофлуоресценции конструкции установки должна учитывать следующие факторы: 1) маскирующее влияние эффекта Вавилова—Черенкова, которое появляется в водных растворах при энергиях излучения больше 130 кэв; 2) влияние рентгеновского излучения на работу ФЭУ: прямое или рассеянное излучение выбивает электроны из баллона, фотокатода и динодов; 3) маскирующее влияние флуоресценции воздуха: известно, что интенсивности рентгенофлуоресценции гелия, кислорода, воздуха и азота относятся как 1 : 2 : 10 : 35 (Самылов и др., 1958); 4) радиолиз исследуемых веществ, который усиливается в присутствии кислорода. В известных установках для регистрации радиолюминесценции (Сапежинский и Эмануэль, 1960) и рентгенолюминесценции (Sommermeyer et al., 1961) биологических объектов указанная специфика не учитывалась. Создать оптимальные условия для регистрации рентгенофлуоресценции попытались авторы в описываемой ниже установке.

Регистрация интенсивности рентгенолюминесценции

Установка, общий вид которой показан на рис. 6.13, предназначена для измерения интенсивности рентгенолюминесценции растворов и сухих веществ.

Б л о к - с х е м а. Рентгеновское излучение от аппарата РУМ-7 1 (рис. 6.14) проходит через фильтры 2 и попадает внутрь

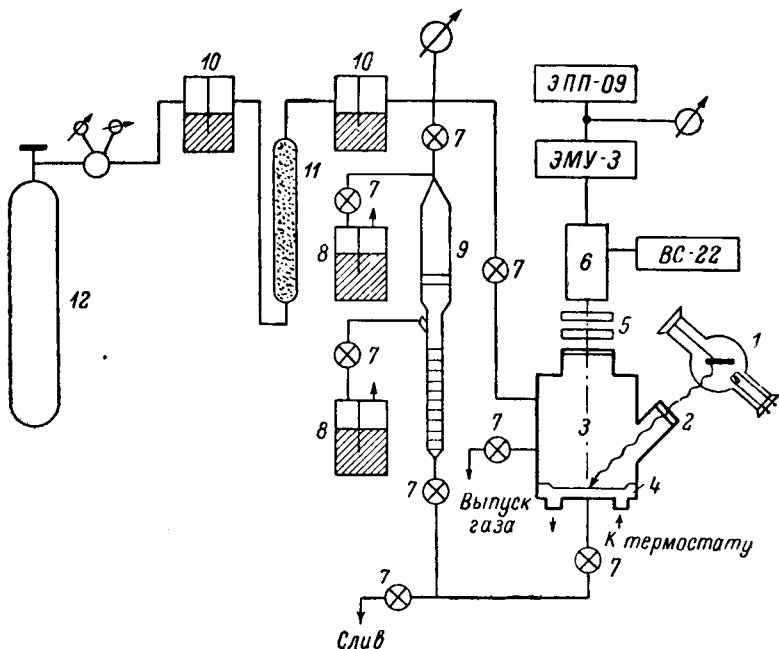


Рис. 6.14. Блок-схема установки для изучения рентгенолюминесценции.

1 — трубка рентгеновского аппарата РУМ-7, 2 — фильтры, 3 — камера, 4 — кювета, 5 — светофильтры, 6 — ФЭУ, 7 — кран, 8 — водный затвор, 9 — бюретка с Шоттовским фильтром, 10, 11 — система промывки газа, 12 — баллон с гелием.

камеры 3, термостабилизированное съемное дно которой 4 служит кюветой. Свет флуоресценции проходит через светофильтры БС-4 и УФС-3 5 и кварцевой линзой фокусируются на фотокатод ФЭУ-46А 6 с увиолевым входом.

В о з б у ж д е н и е. Максимальное напряжение на трубке аппарата РУМ-7 равно 60 кв, квантовая граница непрерывного спектра рентгеновского излучения — 60 кэв; при этом отсутствует излучение Вавилова—Черенкова. Данное напряжение близко к наименьшему значению напряжения (65 кв), при котором достигается практическая однородность излучения для ткани (Аглин-

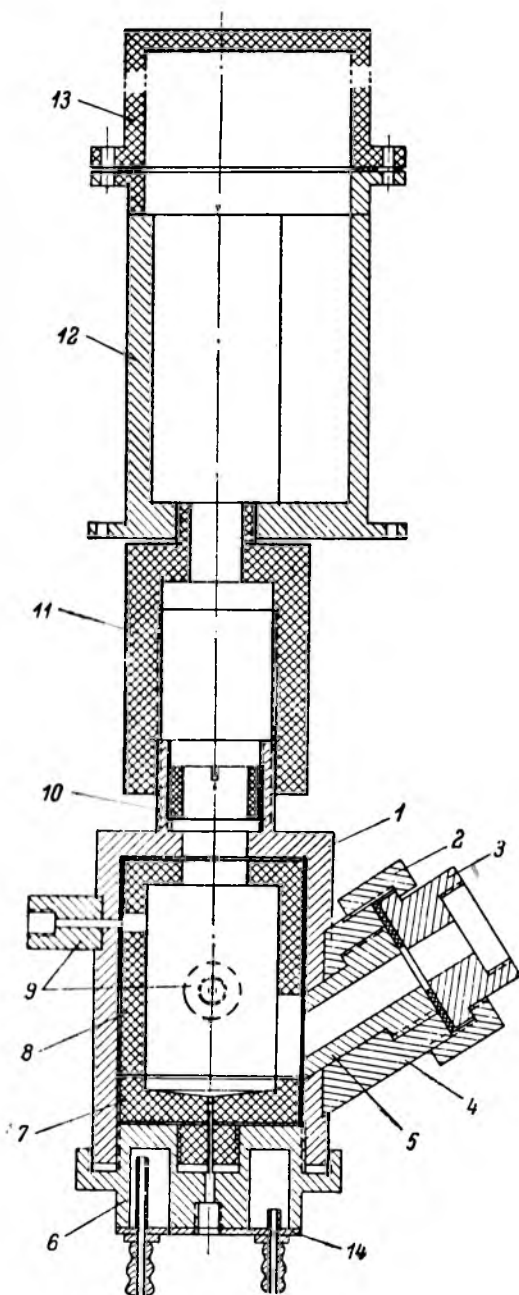


Рис. 6. 15. Разрез камеры для изучения радиолюминесценции.

1, 4 — корпус, 2, 3 — кольца для сочленения с рентгеновской трубкой, 5, 8 — асбестовые вкладыши, 6 — двойное дно, 7 — ювета, 9 — газовые вводы, 10 — гайка для крепления светофильтров, 11 — трубка с внутренней резьбой для линзы, 12 — кожух ФЭУ, 13 — текстолитовая крышка кожуха, 14 — штуцеры для подачи воды из термостата.

цев, 1957). Фильтры, подобранные экспериментально (алюминий — 0.47 мм и органическое стекло — 3 мм), отсекают мягкую часть излучения, наиболее интенсивно возбуждающую свечение газов.

Регистрация. ФЭУ-46А помещается в металлический кожух с герметичной текстолитовой крышкой. При необходимости

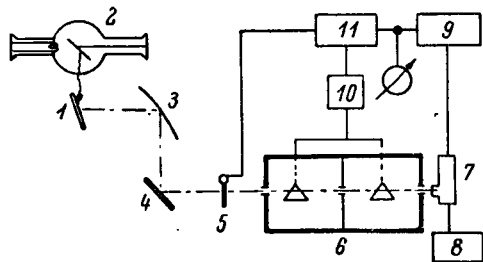


Рис. 6.16. Схема регистрации спектров рентгенофлуоресценции.

1 — объект, 2 — рентгеновская трубка, 3, 4 — зеркала, 5 — модулятор, 6 — двойной монохроматор ДМР-2, 7 — ФЭУ-18А, 8 — источник питания ФЭУ ВС-22, 9 — узкополосный усилитель, 10 — автоматический потенциометр ЭПП-09М2 с отметкой длин волн, 11 — фазовый детектор.

кожух укрепляется внутри металлической коробки, помещенной в пенопластный кожух. В коробку засыпается твердая углекислота для охлаждения ФЭУ, а внутри кожуха помещается силикагель и создается избыточное давление в 0.5 атм. для предотвращения попадания наружного воздуха и запотевания ФЭУ. Сигнал с ФЭУ регистрируется электрометрическим усилителем ЭМУ-3М.

Камера с кюветой. Камера (рис. 6.15) имеет два оптических входа, вводы для газа и растворов и съемное двойное термостабилизированное дно. В дно камеры ввинчивается эбонитовая кювета; из этого же материала изготовлен вкладыш в камеру. Эбонит в той части камеры, которая соприкасается с рентгеновским излучением, применен с целью уменьшения абсолютной интенсивности вторичного излучения (по сравнению с металлическими деталями камеры) и приближения его энергетического распределения к распределению вторичного излучения по энергиям в исследуемых объектах — биополимерах и клетках.

Газовая система. Для уменьшения радиоллиза растворов и свечения газа внутри кюветы воздух в камере заменяется гелием. Для этого гелий из баллона 12 (рис. 6.14) по трубке подается внутрь камеры 3 и оттуда пропускается через бюретку с Шоттовским фильтром 9, заполненную исследуемым раствором. Двадцатиминутный продув гелием водного раствора триптофана, например, уменьшает содержание кислорода настолько, что он не обнаруживается полярографическим анализом. Не вступив в контакт с воздухом, раствор по тем же трубкам перегоняется в кювету.

Регистрация спектров рентгенофлуоресценции

Как уже отмечалось (см. раздел 3.3), рентгенофлуоресценция — слабое свечение. Поэтому даже при соблюдении всех мер, повышающих чувствительность установки к полезному сигналу

(отсутствие свечения Вавилова—Черенкова, замена воздуха гелием, уменьшение рассеянного рентгеновского излучения и охлаждение ФЭУ), не удается зарегистрировать спектры незамороженных растворов белков, нуклеиновых кислот и их составляющих. В большинстве случаев спектральный состав рентгенофлуоресценции оценивается с помощью фильтров, помещенных перед ФЭУ (Сапежинский и Эмануэль, 1960). Однако в некоторых случаях, например при регистрации рентгенофлуоресценции кристаллического триптофана, интенсивность свечения достаточно высока и позволяет воспользоваться для регистрации спектров обычными установками, на которых регистрируются спектры фотolumинесценции при соответствующей замене источника света на рентгеновскую трубку. В частности, спектры рентгенофлуоресценции кристаллического триптофана (рис. 3.1) были получены на установке (рис. 6.16), в которой свет люминесценции модулируется механическим прерывателем 5, раскладывается в спектр двойным монохроматором ДМР-2 6, а затем регистрируется системой, состоящей из ФЭУ-18, избирательного усилителя с синхронным детектором и автоматического потенциометра ЭПП-09.

6.6. УСТАНОВКА ДЛЯ РЕГИСТРАЦИИ СВЕРХСЛАБЫХ СВЕЧЕНИЙ

Обнаружение и регистрация сверхслабых свечений, в частности хемилуминесценции клеток (темновой и митогенетического излучения), стало возможным после того, как были созданы установки, регистрирующие десятки фотонов в секунду (см. гл. 4). В некоторых установках (Colli et al., 1954; Васильев и др., 1959; Владимиров и Литвин, 1959; Cormier, 1960; Тарусов и др., 1962; Fontijn et al., 1964) приемником света служит охлажденный ФЭУ, в других (Авакян и др., 1963; Агавердиев и Тарусов, 1965; Фиш и др., 1965) — малошумящий ФЭУ и в третьих — счетчик фотонов (Троицкий и др., 1961). В принципе для регистрации хемилуминесценции клеток может быть использована любая установка и методика регистрации сверхслабых свечений: метод статистической регистрации на одноэлектронном уровне (Ковалева и др., 1965), астрономический фотометр (Baum, 1955; Артемьев и Рожинова, 1963), счетчики ультрафиолетовых фотонов (Перельман и др., 1959; Шелков и др., 1959).

Перечисленные установки позволяют судить о спектральном составе регистрируемого излучения только с помощью светофильтров. Заслуживает внимания установка для спектрального исследования хемилуминесценции Васильева (1965), которая имеет оригинальный светосильный монохроматор (Васильев и др., 1963) и может записывать спектры слабосветящихся объектов с достаточным разрешением.

Ниже описана разработанная авторами установка, которая предназначена для регистрации сверхслабых свечений при фото-

и хемилюминесценции.* Возможность регистрации сверхслабых свечений определяется использованием охлажденного ФЭУ в сочетании с эффективной системой сбора света. Общий вид такой системы показан на рис. 6.17.

Б л о к - с х е м а. Свечение объекта, помещенного в кювету 2 (рис. 6.18), собирается светопроводом 5 на фотокатод ФЭУ-39 10, охлаждаемого парами жидкого азота. Для оценки спектрального состава излучения между торцом светопровода и фотокатодом ФЭУ помещаются светофильтры. Для возбуждения флуоресценции предусмотрена трубка 6, один конец которой закрыт фотозатвором 8, а другой упирается в края отверстия на поверхности светопровода. Свет лампы СВД-120, стабилизированный по яркости, попадает через боковое отверстие в светопроводе на внутреннюю его поверхность и отражается на дно кюветы. Импульсы с ФЭУ усиливаются широкополосным усилителем УШ-2 «Сирень», интегрируются прибором ИСС-3 и сигнал записывается на ленте автоматического потенциометра ЭПП-09. При интенсивном свечении предусмотрена регистрация сигнала с неохлажденного ФЭУ автоматическим потенциометром с высокоомным выходом типа ЭППВ-60.

С в е т о п р о в о д. Применение светопровода позволяет осуществить эффективный сбор света на фотокатод ФЭУ (70—80 %), но требует очень тщательного изготовления и согласования элементов светопроводящей системы. Материалом светопровода обычно служит плексиглас или стекло (Матвеев и Соколов, 1962; Хабахпашев и Целуйкин, 1964; Авакян и др., 1965), которые, естественно, не подходят при регистрации ультрафиолетового излучения. Кварцевый светопровод слишком дорог; кроме того, технический кварц в толстых слоях заметно поглощает и флуоресцирует. Поэтому нами применен полый, тонкостенный алюминиевый светопровод, тщательно отполированный внутри. Расчет этого светопровода был сделан на основании данных, приведенных Матвеевым и Соколовым (1962). Изготовленный светопровод имеет диаметр нижнего основания 60 мм, верхнего — 30 мм, высоту — 120 мм. Сверху и снизу светопровод герметически закрыт кварцевыми стеклами. Так как светопровод непосредственно прилегает к ФЭУ, охлаждаемому парами жидкого азота, то для предотвращения внутреннего запотевания охлаждавшихся стекол пары азота после выхода из гильзы ФЭУ поступают внутрь светопровода.

К ю в е т а. Герметическая кювета приспособлена для помещения в нее кристаллических веществ и растворов. Диаметр

* Установка позволяет также регистрировать термолюминесценцию биополимеров и их составляющих, что представляет интерес для радиобиологии и фотохимии (Augenstein et al., 1960). Для этой цели имеется полуавтоматическая система, позволяющая нагревать замороженный и облученный объект с различными постоянными скоростями. От скорости нагрева зависит вид кривых термовысвечивания (Лущик, 1955).

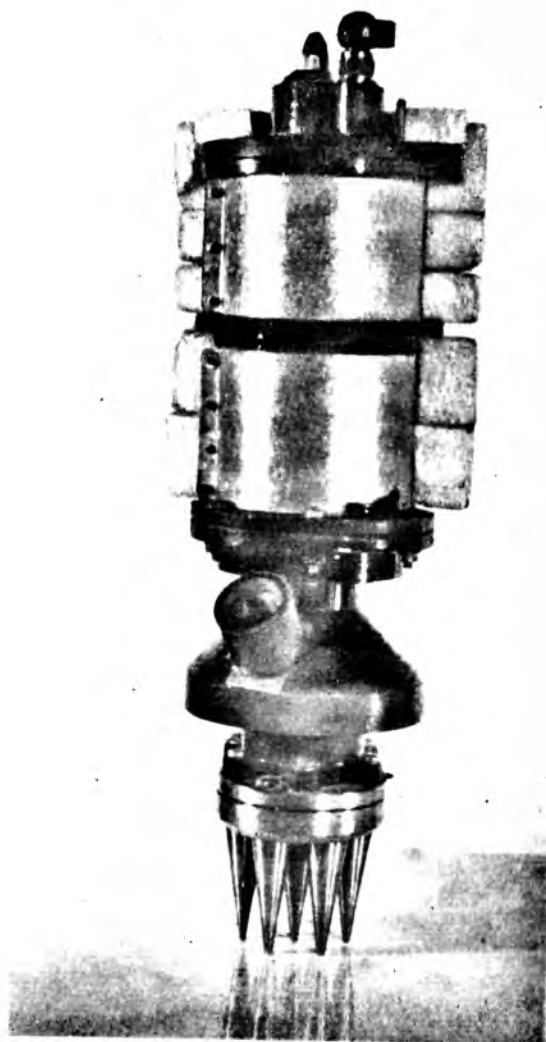


Рис. 6.17. Общий вид камеры для регистрации сверхслабых свечений. Части пенопластовой изоляции сняты. Назначение отдельных деталей понятно из рис. 6.18.

кюветы равен 60 мм, что позволяет иметь большую излучательную поверхность. Крышкой кюветы служит кварцевое стекло, одновременно закрывающее светопровод снизу. В кювете укреплен термопара; кроме того, имеются вводы для изменения газовой среды и подачи раствора. При необходимости в кювету помещается кварцевый вкладыш, исключаящий контакт препарата с металлом. Вкладыш имеет штуцеры, которые соединяются с трубками, связанными с системой залива растворов или взвесей клеток. Газовая среда (кислородная или аноксическая) создается путем подачи кислорода или азота через соответствующий штуцер в кювету. Для обеспечения герметичности кювета имеет кольцевой нож, который вдавливается в прокладку из фторопласта, расположенную в кольцевой канавке.

Кювета снабжена массивными коническими ножками 1, которые погружаются в термостат.

* * *

В заключение еще раз отметим, что только комплексные измерения характеристик люминесценции могут принести успех. Среди этих характеристик одной из важных является время жизни флуоресценции. Тем не менее методы измерений этой характеристики в книге не рассматриваются, что частично связано с технической сложностью вопроса, а частично с почти полным отсутствием работ, в которых использовались бы измерения времени жизни биополимеров и их мономерных звеньев.

Одним из лучших образцов сочетания аппаратуры для одновременного и всестороннего изучения практически всех характеристик люминесценции биологических объектов может служить комплекс аппаратуры, разработанный под руководством проф. Тумермана в Институте молекулярной биологии АН СССР (Морозов и Тумерман, 1965).

К сожалению, мы не можем рекомендовать промышленных спектрофлуориметров с фотоэлектрической регистрацией в УФ области спектра. За рубежом к услугам исследователей широкий выбор фирменной аппаратуры, например спектрофлуориметры Unikum, Amico-Bowman, Farrand, приставка к спектрофотометру Весман, спектрофлуориметр для абсолютных измерений Turner-210 Spectro и т. д., которые широко используются в биологических исследованиях (Udenfriend, 1962). В то же время в нашей стране подобные приборы пока не выпускаются.

Остается только надеяться на то, что, несмотря на необходимость самостоятельного изготовления аппаратуры, возможности люминесцентного анализа, очерченные в этой книге, привлекут к нему внимание новых исследователей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Биология переживает сейчас период бурного роста и в первую очередь это относится к ее молекулярным аспектам. Какой вклад могут внести люминесцентные методы исследования в этот прогресс биологии и какие задачи в связи с этим стоят перед исследователями, применяющими эти методы?

Попытаемся ответить на эти вопросы на основании всего изложенного выше материала.

1. По-прежнему актуальным остается совершенствование методов качественного и количественного анализа. Значение этих методов возрастает еще больше в связи с тем, что молекулярная биология предъявляет повышенные требования к чистоте выделяемых биохимиками веществ, многие из которых к тому же удается получать лишь в ничтожных количествах.

2. Изменения УФ флуоресценции белков — высокочувствительный метод наблюдения за их конформационными переходами. Такие изменения могут происходить не только при искусственных воздействиях денатурирующих агентов на белок, но и в ходе ферментсубстратных реакций *in vitro* и даже при воздействиях на более сложные системы (например, мышцы, некоторые типы клеток). Однако в двух последних случаях методика использования УФ флуоресценции для целей обнаружения конформационных переходов нуждается в дополнительной разработке.

Применение УФ флуоресценции может позволить также решить проблему, которая и возникла, в частности, на основе люминесцентных исследований, — проблему об особой роли ароматических остатков в поддержании структуры белка и в белок-белковом взаимодействии. В связи с последним существенное значение приобретает изучение флуоресцентными методами электронной структуры ароматических аминокислот и зависимости ее от полярности среды. В свою очередь полярность микроокружения остатков ароматических аминокислот в белковой глобуле может быть определена также с помощью этих методов.

Даже в том случае, когда нельзя точно судить о молекулярных основах изменения люминесценции, приложение методов УФ флуоресценции к наблюдению за общим состоянием нормальных и патологически измененных клеток имеет существенное значение для медицины и цитологии.

3. В области изучения люминесценции нуклеиновых кислот следует заново измерить характеристики люминесценции чистых индивидуальных образцов ДНК и РНК. Однако и сейчас уже ясно, что изучение взаимного энергетического положения $\pi\pi^*$ - и $\pi\pi^*$ -уровней от условий среды может представить существенный интерес, в частности, для понимания природы мутаций, связанных с изменением электроной структуры азотистых оснований. В связи с отсутствием люминесценции нуклеиновых кислот в нейтральных водных растворах при возбуждении в нормальной области поглощения особый интерес приобретают исследования люминесценции при возбуждении в области ~ 300 мкм, тем более что конформационные изменения ДНК, ее взаимодействие с белками и, в частности, с гистонами отражаются на характеристиках люминесценции, возбуждаемой в этой области спектра.

4. Возможно, что о некоторых реакциях, происходящих в живой системе, можно судить по хемилюминесценции клеток, которая побочно возникает в ходе этих реакций, связана с окислительными процессами и лежит в видимой области спектра.

Однако это требует детальных исследований, целью которых должна быть идентификация веществ и их электронных состояний, ответственных за свечение. В тех же случаях, когда взаимодействие радикалов с кислородом является одним из основных, а не побочных процессов (при фотохимических или радиационно-химических процессах), хемилюминесценция биополимеров и клеток может быть реальным методом исследования кинетики процессов. Существенным достижением явилось бы обнаружение хемилюминесценции при отсутствии кислорода в конкретных ферментативных реакциях, в белок-синтезирующих системах и т. п.

5. По-прежнему открыт для решения вопрос о функциональной роли УФ хемилюминесценции клеток (митогенетического излучения). Моделирование этого излучения сверхслабыми световыми потоками от физических УФ источников света значительно расширило возможности экспериментальных исследований, но вряд ли на этом пути лежат окончательный ответ.

6. Исследование биолюминесценции в клетках и организмах, обладающих специализированными люциферин-люциферазными системами, помимо изучения природы этого феномена, может быть полезно как в качестве теста на различные воздействия на клетку, так и, возможно, для изучения некоторых вопросов биосинтеза белка на примере люциферазы.

7. Особую роль играют исследования люминесценции биополимеров и клеток для изучения тех процессов (фотохимических

и радиобиологических), в которых возбужденные состояния несомненно играют определенную роль. В частности, исследования характеристик радиолюминесценции биополимеров в зависимости от вида и энергии возбуждающего излучения должны помочь решить все еще не решенный вопрос о вкладе возбужденных электронных состояний макромолекул в общий эффект радиобиологического поражения.

В фотохимических процессах люминесцентные методы уже сейчас позволяют изучать кинетику реакций и обнаруживать промежуточные нестабильные продукты этих реакций.

8. Даже далеко не полное перечисление возможностей, открываемых при изучении люминесценции биополимеров и клеток, показывает необходимость дальнейшего усовершенствования методов регистрации характеристик люминесценции. Основная задача состоит в том, чтобы повысить абсолютную чувствительность к малым световым потокам и к малым изменениям потоков.

Помимо традиционных путей (охлаждение ФЭУ, создание оптимальных схем регистрации, уменьшение световых потерь, создание двухлучевых схем и т. д.), полезным представляется исследование физических процессов, происходящих в ФЭУ для обоснованного подхода к проблеме снижения шумов ФЭУ.

В отношении исследователей к люминесцентным методам наметились сейчас два основных подхода. Оптимисты верят во всемогущество этого метода: его высокая чувствительность, практическая безынерционность, возможность работы на живых объектах обеспечивают, по их мнению, бескрайнюю перспективу. Скептики ссылаются на то, что наблюдаемые изменения фотолюминесценции, например, нельзя однозначно связать с вызывающими их процессами.

Мы надеемся, что фактический материал этой книги поможет определить истинные границы возможностей приложения люминесценции в биологии и будет способствовать решению тех проблем, в исследовании которых люминесцентные методы способны сыграть решающую роль.

* * *

При подготовке книги к печати появился ряд изданий, близких по тематике материалу книги. Наиболее важные из этих изданий указаны в дополнительном списке литературы (см. стр. 231).

Основным закономерностям люминесценции посвящена обширная глава в книге Селиджера и Мак-Элроя (Seliger and McElroy, 1965). В ней большое внимание уделено рассмотрению люминесцентных свойств гетероатомных молекул. Фотолюминесценция белков подробно рассмотрена в книгах Владимирова

(1965) и Конева (1965). Вышла в русском переводе цитируемая в тексте книга Юденфренда (Udenfriend, 1962). Вопросам химилюминесценции посвящены книги Владимирова (1966), Шляпинтоха и др. (1966), Селиджера и Мак-Элроя (Seliger a. McElroy, 1965), обзор Васильева (1966), а также материалы симпозиумов по свободнорадикальным процессам (Шляпинтох, 1966) и химилюминесценции (Wyman, 1965). Современные представления о физике процессов в фотоэлектронных приборах, а также характеристики новых типов ФЭУ даны в книге Соболевой и др. (1965).

ЛИТЕРАТУРА

К введению

- Баренбойм Г. М. 1963. Взаимодействие кислорода с молекулами ароматических аминокислот, белков и нуклеиновых кислот в возбужденном синглетном состоянии. Дисс., Л.
- Бахшиев Н. Г. 1961. Оптика и спектроскопия, 30, 6 : 717—726.
- Бахшиев Н. Г. 1964. Оптика и спектроскопия, 16, 5 : 821—832.
- Бобрович В. И. и Конев С. В. 1964. ДАН СССР, 155, 1 : 197—200.
- Вавилов С. И. 1936. Собр. соч., 1954, М., 1 : 438—448.
- Вавилов С. И. 1950. Микроструктура света. М.
- Вальдман М. М. и Шереметьев Г. Д. 1963. Изв. АН СССР, Сер. физ., 27, 5 : 693—695.
- Волькенштейн М. В. 1955. Строение и физические свойства молекул. М.—Л.
- Волькенштейн М. В. 1965. Молекулы и жизнь. Введение в молекулярную биофизику. М.
- Галанин М. Д. 1960. Тр. Физ. инст. АН СССР, 12 : 3—53.
- Галанин М. Д. и Франк И. М. 1951. Журн. экспер. и техн. физ., 21 : 2, 114—120.
- Ельяшевич М. А. 1962. Атомная и молекулярная спектроскопия. М.
- Ермолаев В. Л. 1963. Успехи физ. наук, 80, 1 : 3—40.
- Ермолаев В. Л. и Свешникова Е. Б. 1962. Изв. АН СССР, Сер. физ., 26, 1 : 29—31.
- Ермолаев В. Л. и Свешникова Е. Б. 1963. ДАН СССР, 149, 6 : 1295—1298.
- Ермолаев В. Л. и Свешникова Е. Б. 1964. Оптика и спектроскопия, 16, 4 : 587—593.
- Ермолаев В. Л. и Теренин А. Н. 1960. Успехи физ. наук, 71, 1 : 137—141.
- Карякин А. В. 1961. Успехи химии, 80, 8 : 1050—1068.
- Константинова-Шлезингер М. А. (ред.). 1961. Люминесцентный анализ. М.
- Левшин В. Л. 1951. Фотолюминесценция жидких и твердых веществ. М.
- Литвин Ф. Ф. и Персонов Р. Н. 1961. ДАН СССР, 136, 4 : 798—800.
- Лилин Г. Н. и Кобышев Г. И. 1963. ДАН СССР, 148, 4 : 1053—1059.
- Неспорент Б. С. и Бахшиев Н. Г. 1960. Оптика и спектроскопия, 8, 6 : 777—786.
- Пурмухаметов Р. Н., Попова Е. Г., Докунихин Н. С. 1960. Оптика и спектроскопия, 9, 5 : 593—600.
- Свешников Б. Я. 1952. Успехи физ. наук, 46, 3 : 331—347.

- Севченко А. Н., Соловьев К. Н., Шкирман С. Ф. и Са-
 жевская М. В. 1963. ДАН СССР, 153, 6 : 1391—1394.
- Степанов Б. И. 1955. Люминесценция сложных молекул, ч. 1. Минск.
- Степанов Б. И. и Грибковский В. П. 1963. Введение в теори-
 люминесценции. Минск.
- Теренин А. Н. 1947. Фотохимия красителей и родственных органиче-
 ских соединений. М.—Л.
- Теренин А. Н. и Ермолаев В. Л. 1952. ДАН СССР, 85, 3 : 547—
 550.
- Феофилов П. П. 1948. Успехи физ. наук, 36, 4 : 417—455.
- Феофилов П. П. 1959. Поляризованная люминесценция атомов, моле-
 кул и кристаллов. М.
- Шигорин Д. Н., Щеглова Н. А. и Докунихин Н. С. 1962
 В сб.: Физ. пробл. спектроскопии, М., 1 : 292—294.
- Шпольский Э. В. 1959. Успехи физ. наук, 68, 1 : 51—68.
- Шпольский Э. В. 1960. Успехи физ. наук, 71, 2 : 215—242.
- Шпольский Э. В. 1962. Успехи физ. наук, 77, 2 : 321—335.
- Шпольский Э. В. 1963. Успехи физ. наук, 80, 2 : 255—279.
- Шпольский Э. В. 1965а. Природа, 10 : 22—29.
- Шпольский Э. В. 1965б. Природа, 11 : 6—16.
- Шпольский Э. В. и Ильина А. А. 1951. Журн. exper. и техн.
 физ., 21, 2 : 142—149.
- Шпольский Э. В., Ильина А. А. и Климова Л. А. 1952.
 ДАН СССР, 87, 6 : 935—938.
- Börresen H. C. 1963. Acta Chem. Scand., 17, 4 : 921—929.
- Dexter D. L. 1953. J. Chem. Phys., 21, 5 : 836—850.
- Dupuy F., Lochet R. and Rousset A. 1964. Compt. rend. Acad.
 Sci., 258, 17 : 4223—4227.
- Förster T. 1948. Ann. Physik., 2 : 55—75.
- Förster T. 1959. Discus. Faraday Soc., 27 : 7—17.
- Franck J. and Sponer H. 1956. J. Chem. Phys., 25, 1 : 172.
- Kanda Y. and Shimada R. 1961. Spectrochim. Acta, 17, 3 : 279—285.
- Kanda Y., Shimada R. and Takenoshita Y. 1963. Spectrochim.
 Acta, 19, 7 : 1249—1260.
- Kasha M. 1950. Discus. Faraday Soc., 9 : 14—19.
- Kasha M. 1960. Radiation Res., Suppl. 2 : 243—275.
- Kasha M. 1961. In: Light and Life. Baltimore : 31—64.
- Lamola A. A., Loermakers P. A. and Byers G. W. 1965. J. Amer.
 Chem. Soc., 87, 11 : 2322—2332.
- McClure D. S. 1951. J. Chem. Phys., 19, 6 : 670—675.
- McClure D. S. 1959. Solid State Physics, 8, 1 : 1—47. (Перевод:
 Мак-Клор Д. С. 1961. Усп. физ. наук, 74, 1 : 87—123).
- McGlynn S. P., Smith F. J. and Cilento G. 1964. Photochem.
 and Photobiol., 3, 4 : 269—294.
- Parker C. A. 1964. In: Advances in photochemistry, N. Y.—London—
 Sydney, 2 : 306—383.
- Pringsheim P. 1949. Fluorescence and phosphorescence. N. Y.—London.
 (Перевод: Прингсгейм П. 1961. Флуоресценция и фосфоресцен-
 ция. М.).
- Rao C. N. R. 1961. Ultra-violet and visible spectroscopy chemical applica-
 tion. London. (Перевод: Рао Ч. Н. Р. 1964. Электронные спектры
 в химии. М.).
- Robinson G. W. and Frosch R. P. 1962. J. Chem. Phys., 37,
 9 : 1962—1973.
- Robinson G. W. and Frosch R. P. 1963. J. Chem. Phys., 38,
 5 : 1187—1203.
- Sidman J. W. 1958. Chem. Revs, 58, 4 : 689—713.
- Sternlicht H., Nieman G. and Robinson G. 1963. J. Chem.
 Phys., 38, 6 : 1326—1335.

- Udenfriend S. 1962. Fluorescence assay in biology and medicine. N. Y.—London.
- West W. 1956. Chemical applications of spectroscopy. N. Y. (Перевод: Вест В. 1959. Применение спектроскопии в химии. М.).
- Wilkinson F. 1964. In: Advances in photochemistry, N. Y.—London—Sydney, 3 : 241—268.

К главе 1

- Агроскин Л. С. и Барский И. Я. 1961. ДАН СССР, 139, 4 : 987—990.
- Агроскин Л. С. и Королев Н. В. 1961. Биофизика, 6, 4 : 478—485.
- Агроскин Л. С. и Помощникова Н. А. 1962. Биофизика, 7, 3 : 292—297.
- Агроскин Л. С., Предтеченский Ю. Б., Барский И. Я. и Шудель М. С. 1964. В сб.: Электронная и флуоресцентная микроскопия клетки, М.—Л. : 152—157.
- Баренбойм Г. М. 1962. Биофизика, 7, 2 : 227—232.
- Баренбойм Г. М. 1963. Взаимодействие кислорода с молекулами ароматических аминокислот, белков и нуклеиновых кислот в возбужденном синглетном состоянии. Дисс., Л.
- Баренбойм Г. М., Барский И. Я., Брумберг Е. М. и Пинто Р. И. 1962. Биофизика, 7, 3 : 351—356.
- Баренбойм Г. М., Барский И. Я. и Пинто Р. И. 1961. Радиобиология, 1, 6 : 843—850.
- Баренбойм Г. М., Пинто Р. И. и Правдина К. И. 1963. Радиобиология, 3, 1 : 8—11.
- Барский В. Е., Зеленин А. В. и Ляпунова Е. А. 1962. В сб.: XI Совещание по люминесценции, Тез. докл., М. : 6.
- Барский И. Я. 1964. Разработка фотографических и фотоэлектрических методов и аппаратуры ультрафиолетовой флуоресцентной микроскопии для исследования биологических объектов. Автореф. дисс., Л.
- Барский И. Я. и Брумберг Е. М. 1958. Биохимия, 23, 5 : 791—792.
- Барский И. Я., Брумберг Е. М. и Брумберг В. А. 1962. ДАН СССР, 147, 2 : 474—476.
- Барский И. Я., Брумберг Е. М., Бухман М. П., Василевская Е. И. и Плужникова Г. Ф. 1959. Ботан. журн., 44, 5 : 639—642.
- Барский И. Я., Брумберг Е. М. и Кондратьева Т. М. 1961. Биофизика, 6, 5 : 606—609.
- Барский И. Я. и Брумберг И. Е. 1962. Цитология, 4, 3 : 328—330.
- Бирюзова В. И. и Мейсель М. Н. 1964. В сб.: Молекулярная биология, М. : 316—323.
- Бобрович В. П. и Конев С. В. 1964. ДАН СССР, 155, 1 : 197—200.
- Бобрович В. П. и Конев С. В. 1965. ДАН БССР, 9, 2 : 118—121.
- Бреслер В. М. 1965. В сб.: Физико-химические основы авторегуляции в клетках, Тез. докл., М. : 17.
- Бреслер В. М., Брумберг Е. М., Кудрявцева М. В., Пильщик Е. М., Черногрядская Н. А. и Шудель М. С. 1965. Бюлл. эксперим. биол. и мед., 59, 5 : 89—92.
- Бреслер В. М. и Воробьев В. И. 1965. В сб.: Электронная и флуоресцентная микроскопия клетки, М.—Л. : 124—130.
- Бреслер В. М., Кудрявцева М. В., Пильщик Е. М., Черногрядская Н. А. и Шудель М. С. 1964. В сб.: Электронная и флуоресцентная микроскопия клетки, М.—Л. : 93—98.
- Бреслер В. М., Черногрядская Н. А., Пильщик Е. М., Кудрявцева М. В., Шудель М. С., Розанов Ю. М., Асташина Т. Н. и Веселкина М. И. 1964. В сб.: XIII Совещание по люминесценции, Тез. докл., М. : 17.

- Бреслер В. М., Черногрядская Н. А., Пильщик Е. М., Шудель М. С., Кудрявцева М. В., Асташина Т. П., Розанов Ю. М. и Селиванова Г. В. 1965. В сб.: Физико-химические основы авторегуляции в клетках, Тез. докл., М.: 9—10.
- Бреслер С. Е. 1963. Введение в молекулярную биологию. М.—Л.
- Брумберг Е. М. 1956. Журн. общ. биол., 17, 6: 401—412.
- Брумберг Е. М. и Барский И. Я. 1960. Цитология, 2, 3: 318—324.
- Брумберг Е. М. и Барский И. Я. 1961. Журн. общ. биол., 22, 6: 459—466.
- Брумберг Е. М., Барский И. Я. и Кондратьева Т. М. 1961. Биофизика, 6, 5: 605—609.
- Брумберг Е. М., Барский И. Я., Кондратьева Т. М. и Черногрядская Н. А. 1961. Биофизика, 6, 1: 114—118.
- Брумберг Е. М., Барский И. Я., Кондратьева Т. М., Черногрядская Н. А. и Шудель М. С. 1960. ДАН СССР, 135, 6: 1521—1524.
- Брумберг Е. М., Барский И. Я., Черногрядская Н. А. и Шудель М. С. 1963а. ДАН СССР, 150, 6: 1356—1358.
- Брумберг Е. М., Барский И. Я., Черногрядская М. А. и Шудель М. С. 1963б. Изв. АН СССР, Сер. биол., 1: 87—90.
- Брумберг Е. М., Барский И. Я. и Шудель М. С. 1960. Цитология, 2, 5: 589—591.
- Брумберг Е. М. и Брумберг И. Е. 1964. Биофизика, 9, 6: 748—750.
- Брумберг Е. М., Мейсель М. Н., Барский И. Я. и Бухман М. П. 1958. Журн. общ. биол., 19, 2: 99—107.
- Брумберг Е. М., Мейсель М. Н., Барский И. Я., Зеленин А. В. и Ляпунова Е. А. 1961. ДАН СССР, 141, 3: 723—725.
- Брумберг Е. М., Черногрядская Н. А. и Шудель М. С. 1964. В сб.: Электронная и флуоресцентная микроскопия клетки, М.—Л.: 74—81.
- Брумберг И. Е. 1964. Биофизика, 9, 3: 382—383.
- Брумберг И. Е. и Брумберг Е. М. 1964а. Биофизика, 9, 2: 237—238.
- Брумберг И. Е. и Брумберг Е. М. 1964б. Биофизика, 9, 4: 502—503.
- Брумберг И. Е. и Дунаева С. Е. 1964. Цитология, 6, 6: 766—768.
- Бурштейн Э. А. 1961. Биофизика, 6, 6: 753—763.
- Бурштейн Э. А. 1964. Применение спектральных методов в исследовании функциональных состояний белков. Автореф. дисс., М.
- Бурштейн Э. А. и Суслова Т. Б. 1964. Биофизика, 9, 2: 184—193.
- Владимиров Ю. А. 1957. ДАН СССР, 116, 5: 780—783.
- Владимиров Ю. А. 1961. ДАН СССР, 136, 4: 960—963.
- (Владимиров Ю. А.) Vladimirov Y. A. 1965. Photochem. and Photobiol., 4, 3: 369—384.
- Владимиров Ю. А. и Бурштейн Э. А. 1960. Биофизика, 5, 4: 385—392.
- Владимиров Ю. А. и Конев С. В. 1957. Биофизика, 2, 1: 3—19.
- Владимиров Ю. А. и Конев С. В. 1959. Биофизика, 4, 5: 533—540.
- Владимиров Ю. А. и Личинь-го. 1962. Биофизика, 7, 3: 270—280.
- Волькенштейн М. В. 1965. Молекулы и жизнь. Введение в молекулярную биологию. М.
- Кондратьева Т. М., Сафронова В. Г., Барский И. Я. и Брумберг Е. М. 1964. В сб.: Электронная и флуоресцентная микроскопия клетки, М.—Л.: 108—113.
- Конев С. В. 1964. Вестн АН БССР, 3: 59—68.
- Конев С. В. и Бобрович В. П. 1965. Биофизика, 10, 5: 813—816.

- Конев С. В., Бобровиц В. П. и Черницкий Е. А., 1965. Биофизика, 10, 1 : 42—47.
- Конев С. В. и Катибников М. А. 1961. ДАН СССР, 136, 2 : 472—465.
- Конев С. В., Катибников М. А. и Лыскова Т. И. 1964. Биофизика, 9, 1 : 124—127.
- Конев С. В., Катибников М. А. и Петрова М. А. 1961. Биофизика, 6, 3 : 375.
- Конев С. В. и Лыскова Т. И. 1965. Биофизика, 10, 4 : 694—695.
- Конев С. В., Лыскова Т. И. и Бобровиц В. П. 1963. Биофизика, 8, 4 : 433—440.
- Конев С. В., Лыскова Т. И. и Салоско П. Н. 1963. Биофизика, 8, 2 : 260—268.
- Конев С. В. и Черницкий Е. А. 1964. Биофизика, 9, 4 : 520—522.
- Конев С. В. и Черницкий Е. А. 1965. ДАН БССР, 9, 5 : 328—330.
- Мантейфель В. М. и Мейсель М. Н. 1962. Радиобиология, 2, 1 : 101—104.
- Машанский В. Ф. 1965. В сб.: Руководство по цитологии, М., 1 : 200—218.
- (Мейсель М. Н., Брумберг Е. М., Кондратьева Т. М. и Барский И. Я.) Meissel M. N., Brumberg E. M., Kondratjeva T. M. and Barsky I. J. 1961. In: The initial effect of ionizing radiations on cells, N. Y.—London : 107—129.
- Мейсель М. Н., Гуткина А. В., Зеленин А. В., Огневецкая Н. Е., Воротницкая Н. Е., Ляпунова Е. А. и Барский В. Е. 1962. В сб.: Тр. VIII Междунар. противоракового конгр., М., 4 : 71—73.
- Мейсель М. Н. и Мантейфель В. М. 1963. Изв. АН СССР, Сер. биол., 6 : 871—879.
- Насонов Д. Н. 1959. Местная реакция протоплазмы и распространяющееся возбуждение. М.—Л.
- Насонов Д. Н. и Александров В. Я. 1940. Реакция живого вещества на внешние воздействия. М.—Л.
- Нейфах С. А. 1964. В сб.: Молекулярная биология, М. : 273—280.
- Пильщик Е. М. и Кудрявцева М. В. 1965. Арх. анат., гистол. и эмбриол., 48, 4 : 49—53.
- Пильщик Е. М., Кудрявцева М. В. и Розанов Ю. М. 1964. В сб.: Электронная и флуоресцентная микроскопия клетки, М.—Л. : 98—107.
- Пильщик Е. М. и Николаева М. В. 1963. ДАН СССР, 148, 1 : 199—201.
- Поглазов Б. Ф. 1965. Структура и функции сократительных белков. М.
- Помощников Н. А. и Агроскин Л. С. 1961. Радиобиология, 1, 6 : 838—842.
- Риль Н. 1948. Миграция энергии. М.—Л.
- Розанов Л. М., Барский И. Я. и Брумберг Е. М. 1962. В сб.: Тр. VIII Междунар. противоракового конгр., М., 4 : 68—70.
- Розанова Л. М., Барский И. Я. и Брумберг Е. М. 1963. ДАН СССР, 150, 4 : 907—908.
- Севченко А. Н., Конев С. В. и Катибников М. А. 1963. ДАН СССР, 153, 4 : 875—877.
- Тарусов Б. Н. 1960. Основы биофизики и биофизической химии. М., 1.
- Трошин А. С. и Баренбойм Г. М. 1963. Вести. АН СССР, 6 : 73—76.
- Хан-Магомедова Ш. Д., Гуткина А. Б., Мейсель М. Н., Агроскин Л. С. и Королев Н. В. 1960. Биофизика, 5, 4 : 446—449.
- Хрущев Н. Г. 1963. Арх. анат., гистол. и эмбриол., 46, 2 : 39—45.
- Черницкий Е. А. и Конев С. В. 1965. Журн. прикл. спектроскопии, 2, 3 : 261—266.

- Черницкий Е. А., Конев С. В. и Бобрович В. П. 1963. ДАН БССР, 7, 9: 628—632.
- Черногрядская Н. А., Бреслер В. М., Пильщик Е. М., Кудрявцева М. В. и Шудель М. С. 1965. В сб.: Физико-химические основы авторегуляции в клетках, Тез. докл., М.: 42—43.
- (Черногрядская Н. А., Брумберг Е. М., Бреслер В. М., Пильщик Е. М., Шудель М. С., Кудрявцева М. В. и Асташина Т. Н.) Tchernogrjadskaia N. A., Brumberg E. M., Bresler V. M., Pilshtchik E. M., Schudel M. S., Kudrjavseva M. V. and Astashina T. N. 1964. In: II Internat. congr. of histo- and cytochemistry, Frankfurt-Main: 217.
- Черногрядская Н. А., Бузе Э. Г. и Асташина Т. Н. 1964. В сб.: XIII Соевещание по люминесценции, Тез. докл., М.: 114.
- Черногрядская Н. А., Пильщик Е. М., Шудель М. С., Кудрявцева М. В. и Асташина Т. П. 1964а. ДАН СССР, 156, 1: 174—176.
- Черногрядская Н. А., Пильщик Е. М., Шудель М. С., Кудрявцева М. В. и Асташина Т. П. 1964б. В сб.: Электронная и флуоресцентная микроскопия клетки, М.—Л.: 82—87.
- Черногрядская Н. А. и Шудель М. С. 1962а. ДАН СССР, 145, 4: 917—919.
- Черногрядская Н. А. и Шудель М. С. 1962б. В сб.: II Научн. конф. Института цитологии АН СССР, Тез. докл., Л.: 82—83.
- Штранкфельд И. Г. 1963. Биофизика, 8, 6: 690—695.
- Штранкфельд И. Г. 1964а. ДАН СССР, 154, 4: 953—955.
- Штранкфельд И. Г. 1964б. ДАН СССР, 155, 2: 461—464.
- Штранкфельд И. Г. 1964в. Биофизика, 9, 1: 68—72.
- Штранкфельд И. Г. 1964г. В сб.: Электронная и флуоресцентная микроскопия клетки, М.—Л.: 131—136.
- Шудель М. С. 1964а. В сб.: Материалы IV Конф. по вопросам регенерации и клеточного размножения, М.: 156—157.
- Шудель М. С. 1964б. В сб.: Электронная и флуоресцентная микроскопия клетки, М.—Л.: 88—93.
- Шудель М. С. 1965. Цитология, 7, 3: 377—386.
- Шудель М. С., Черногрядская Н. А., Брумберг В. А., Розанов Ю. М. и Брумберг Е. М. 1964. ДАН СССР, 157, 2: 447—450.
- Augenstein L. and Nag-Chaudhuri J. 1964. Nature, 203, 4950: 1145—1147.
- Basq Z. M. and Alexander P. 1961. Fundamentals of radiobiology. Oxford—London—N. Y.—Paris. (Перевод: Бак З. и Александер П. 1963. Основы радиобиологии. М.).
- Beaven C. H. 1961. In: Advances in Spectroscopy. N. Y.—London, 2: 341—428.
- Brand L., Everse Y. and Kaplan N. O. 1962. Biochemistry, 1, 3: 423—432.
- Cornog J. L. and Adams W. R. 1963. Biochim. Biophys. Acta, 66, 3: 356—365.
- Cowgill R. W. 1963a. Arch. Biochem. Biophys., 100, 1: 36—44.
- Cowgill R. W. 1963b. Biochim. Biophys. Acta, 75, 2: 272—273.
- Cowgill R. W. 1964a. Arch. Biochem. Biophys., 104, 1: 84—92.
- Cowgill R. W. 1964b. Biochem. Biophys. Res. Comm., 16, 4: 332—335.
- Cowgill R. W. 1965a. Biochim. Biophys. Acta, 94, 1: 74—80.
- Cowgill R. W. 1965b. Biochim. Biophys. Acta, 94, 1: 81—88.
- Debye P. and Edwards J. O. 1952. Science, 116, 3006: 143—144.
- Dimartin M., Lochet R., Rybak B. and Rousset A. 1957. Compt. rend. Acad. Sci., 244, 24: 2905—2909.
- Donovan L. G. 1963. Biochim. Biophys. Acta, 78, 3: 474—491.

- Doty P. and Gratzer W. B. 1962. In: Polyamino acids, polypeptides and protein, Madison : 111—118.
- Douzou P. and Francq J. 1962. J. Chim. Phys. et Phys-Chim. Biol., 59, 6 : 578—583.
- Edelhoch H., Brand L. and Wilcheck M. 1963. Israel J. Chem., 1, 3a : 216—217.
- Edelhoch H., Frattaly V. and Steiner R. F. 1965. J. Biol. Chem., 240, 1 : 122—127.
- Edelhoch H. and Steiner R. F. 1962. Biochim. Biophys. Acta, 60, 2 : 365—372.
- Edelhoch H. and Steiner R. F. 1963. J. Biol. Chem., 238, 3 : 931—938.
- Edelhoch H. and Steiner R. F. 1964. In: Electronic aspects of biochemistry, N. Y.—London : 7—22.
- Eley D. D. 1962. In: Horizons in biochemistry, N. Y.—London : 341—380. (Перевод: Эли Д. 1964. В сб.: Горизонты биохимии, М. : 261—292).
- Fasman G., Norland K. and Pesce A. 1964. Biopolymers, Symp. 1. Quantum aspects of polypeptides and polynucleotides, N. Y. : 325—331.
- Feitelson F. 1964. J. Phys. Chem., 68, 2 : 391—397.
- Frattaly V., Steiner R. F. and Edelhoch H. 1965. J. Biol. Chem., 240, 1 : 112—121.
- Freed S. and Salmre W. 1958. Science, 128, 3335 : 1341—1342.
- Fujimori E. 1960. Biochim. Biophys. Acta, 40, 2 : 251—256.
- Gally J. A. and Edelman G. M. 1962. Biochim. Biophys. Acta, 60, 3 : 499—509.
- Gally J. A. and Edelman G. M. 1964. Biopolymers, Symp. 1. Quantum aspects of polypeptides and polynucleotides, N. Y. : 367—381.
- Gerstein Y. F., Van Vunakis H. and Levine L. 1963. Biochemistry, 2, 5 : 964—971.
- (Green D. E.) Грин Д. Е. 1964. В сб.: Молекулярная биология, М. : 260—271.
- Green D. E. and Fleischer S. 1962. In: Horizons of biochemistry, N. Y.—London : 381—420. (Перевод: Грин Д. Е. и Флейшер С. 1964. В сб.: Горизонты биохимии, М. : 293—325).
- (Hunter F. E.) Хантер Ф. Э. 1962. В сб.: Тр. V Междунар. биохим. конгр., М., 5 : 301—320.
- Herskovits T. T. and Laskowski M. 1962. J. Biol. Chem., 237, 11 : 3418—3422.
- Isenberg I. and Szent-Györgyi A. 1958. Proc. Acad. Sci. USA, 44, 6 : 519—521.
- Leninger A. L. 1962a. In: Horizons of biochemistry, N. Y.—London : 421—435. (Перевод: Ленингер А. 1964. В сб.: Горизонты биохимии, М. : 326—338).
- (Leninger A. L.) Ленингер А. Л. 1962в. В сб.: Тр. V Междунар. биохим. конгр., М., 5 : 253—274.
- Leninger A. L. 1964. The mitochondrion. Molecular basis of structure and function. N. Y.—Amsterdam.
- Lehrer S. S. and Fasman G. 1964. Biopolymers, 2, 2 : 199—203.
- Longin P. 1959. Compt. rend. Acad. Sci., 248, 13 : 1971—1973.
- Longworth J. W. 1961. Biochem. J., 81, 1 : 24p—25p.
- Mataga N., Torihashi J. and Esumi K. 1964. Theoret. Chim. Acta (Berlin), 2, 2 : 158—167.
- McLaren A. D. and Shugar D. 1964. In: Photochemistry of proteins and nucleic acids, Oxford : 29—87.
- Nag-Chaudhuri J. and Augenstein L. 1964. Biopolymers, Symp. 1. Quantum aspects of polypeptides and polynucleotides, N. Y. : 441—452.
- Pesce A., Bodenheimer E., Norland K. and Fasman G. 1964. J. Amer. Chem. Soc., 86, 24 : 5669—5675.

- Perlman G. F. 1964. Biopolymers, Symp. 1. Quantum aspects of polypeptides and polynucleotides, N. Y. : 383—387.
- Pullman B. and Pullman A. 1963. Quantum biochemistry. N. Y.—London. (Перевод: Пульман Б. и Пульман А. 1965. Квантовая биохимия. М.).
- Rosenheck K. and Weber G. 1961. Biochem. J., **79**, 3 : 29p.
- Rybac B., Lochet R. and Rousset A. 1955. Compt. rend. Acad. Sci., **241**, 19 : 1278—1280.
- Steele R. H. and Szent-Györgyi A. 1957. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **43**, 6 : 477—499.
- Steele R. H. and Szent-Györgyi A. 1958. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **44**, 6 : 540—545.
- Steiner R. F. and Edelhoch H. 1961. Nature, **192**, 4805 : 873—874.
- Steiner R. F. and Edelhoch H. 1962a. Nature, **193**, 4813 : 375—376.
- Steiner R. F. and Edelhoch H. 1962b. Chem. Revs, **62**, 5 : 457—483.
- Steiner R. F. and Edelhoch H. 1963a. Biochim. Biophys. Acta, **66**, 3 : 341—355.
- Steiner R. F. and Edelhoch H. 1963b. J. Biol. Chem., **238**, 3 : 931—938.
- Steiner R. F., Lippoldt E., Edelhoch H. and Frattali V. 1964. Biopolymers, Symp. 1. Quantum aspects of polypeptides and polynucleotides, N. Y. : 355—366.
- Straub F. B. 1961. Byokemia. Budapest. (Перевод: Штрауб Ф. 1963. Биохимия. Будапешт).
- Stryer L. 1960. Radiation Res., Suppl. 2 : 432—451.
- Sturtevant Y. M. 1962. Biochem. Biophys. Res. Comm., **8**, 4 : 321—325.
- Szent-Györgyi A. 1957. Bioenergetics. N. Y. (Перевод: Сент-Дьердьи А. 1960. Биоэнергетика. М.).
- Szent-Györgyi A. 1960. Introduction to a submolecular biology. N. Y.—London. (Перевод: Сент-Дьердьи А. 1964. Введение в субмолекулярную биологию. М.).
- Teale F. W. J. 1960. Biochem. J., **76**, 2 : 381—388.
- Teale F. W. J. 1961. Photoelectr. Spectrom. Group Bull., **13** : 346—348.
- Teale F. W. J. and Weber G. 1957. Biochem. J., **65**, 3 : 476—482.
- Teale F. W. J. and Weber G. 1959. Biochem. J., **72**, 2 : 15p.
- Thorne C. Y. R. and Kaplan N. O. 1963. J. Biol. Chem., **238**, 5 : 1861—1868.
- Udenfriend S. 1962. Fluorescence assay in biology and medicine. N. Y.—London.
- Ungar G. and Romano D. V. 1962. J. Gen. Physiol., **46**, 2 : 267—275.
- Van Duuren B. L. 1961. J. Org. Chem., **26**, 8 : 2954—2960.
- Wada A. and Ueno V. 1964. Biopolymers, Symp. 1. Quantum aspects of polypeptides and polynucleotides, N. Y. : 343—353.
- Wang Shu-Fang, Kawahara F. S. and Talalay P. 1963. J. Biol. Chem., **238**, 2 : 576—586.
- Weber G. 1960a. Biochem. J., **75**, 2 : 335—345.
- Weber G. 1960b. Biochem. J., **75**, 2 : 345—352.
- Weber G. 1961a. In: Light and Life, Baltimore : 82—107.
- Weber G. 1961b. Nature, **190**, 4770 : 27—29.
- Weber G. 1961c. Biochem. J., **79**, 3 : 29p—30p.
- Weber G. and Wold F. 1963. Federat. Proc., **22**, 2, pt. 1 : 348.
- Weber G. and Rosenheck K. 1964. Biopolymers, Symp. 1. Quantum aspects of polypeptides and polynucleotides, N. Y. : 333—341.
- Wetlaufer D. B. 1962. Advances Protein Chem., **17** : 303—390.
- White A. 1959. Biochem. J., **71**, 2 : 217—220.
- Yamazaki F., Fujiki K. and Murayama V. 1965. Bull. Chem. Soc. Japan, **38**, 1 : 8—12.

- Yeagers E. and Augenstein L. 1965. *Biophysical J.*, 5, 5 : 687—696.
- Zimmerman H. and Joop N. 1961. *Z. Electrochem.*, 65, 1 : 61—65

К главе 2

- Агроскин Л. С., Королев Н. В., Кулаев И. С., Мейсель М. Н. и Помощникова Н. А. 1960. *ДАН СССР*, 131, 6 : 1440—1443.
- Агроскин Л. С., Королев Н. В., Кулаев И. С. и Помощникова Н. А. 1961. *ДАН СССР*, 136, 1 : 226—229.
- Баев А. А. 1965. В кн.: *Биосинтез белка и нуклеиновых кислот*, М. : 126—171.
- Баренбойм Г. М., Доманский А. Н. и Правдина К. И. 1963. В сб.: *XV Совет. по спектроскопии*, Тез. докл., Минск : 14.
- Барский И. Я. 1959. *Биохимия*, 24, 5 : 823—825.
- Блюменфельд Л. А. 1959. *Биофизика*, 4, 5 : 515—520.
- Бреслер С. Е. 1963. *Введение в молекулярную биологию*. М.—Л.
- Венкстерн Т. В. и Баев А. А. 1965. *Спектры поглощения минорных оснований, их нуклеозидов, нуклеотидов и некоторых олигорибонуклеотидов*. М.
- Волькенштейн М. В. 1965. *Молекулы и жизнь. Введение в молекулярную биофизику*. М.
- Гачковский В. Ф. 1960. *ДАН СССР*, 133, 6 : 1358—1360.
- Спирин А. С. 1963. *Некоторые проблемы макромолекулярной структуры рибонуклеиновых кислот*. М.
- Сухоруков Б. И., Мошковский Ю. М., Бирштейн Т. М. и Лысов В. Н. 1963. *Биофизика*, 8, 3 : 294—300.
- Тихоненко Т. И. 1965. В сб.: *Биосинтез белка и нуклеиновых кислот*, М. : 193—276.
- Basu S. and Greist I. H. 1963. *J. Chim. Phys. et Phys.-Chim. Biol.*, 60, 3 : 407—411.
- Basu S. and Lox L. 1962. *J. Chim. Phys. et Phys.-Chim. Biol.*, 59, 10 : 1031—1032.
- Basu S. and Lox L. 1963. *Biochim. Biophys. Acta*, 76, 1 : 131—135.
- Boaven G. H., Holiday E. R. and Johnson E. A. 1955. In: *The Nucleic acids*, N. Y., 1 : 493—553.
- Bersohn R. and Isenberg J. 1963. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 13, 3 : 205—208.
- Bersohn R. and Isenberg J. 1964. *J. Chem. Phys.*, 40, 11 : 3175—3180.
- Börresen H. C. 1963a. *Acta Chem. Scand.*, 17, 4 : 921—929.
- Börresen H. C. 1963b. *Acta Chem. Scand.*, 17, 8 : 2359—2360.
- Broomhead J. M., Gelboin H. V., Luborsky S. W., Richards H. H. and Singer M. F. 1962. *Biochim. Biophys. Acta*, 61, 3 : 354—367.
- Cockran W. 1951. *Acta Crystallogr.*, 4, 2 : 81—92.
- Douzou P., Franco J., Hanss M. and Ptak M. 1961. *J. Chim. Phys.*, 58, 10 : 926—933.
- Duggan D. E., Bowman R. L., Brodie B. B. and Udenfriend S. 1957. *Arch. Biochem. Biophys.*, 68, 1 : 1—14.
- Isenberg J. and Bersohn R. 1964. In: *Electronic aspects of biochemistry*. N. Y.—London : 3—5.
- Longworth J. W. 1962. *Biochem. J.*, 84, 3 : 104p—105p.
- McLaren A. D. and Shugar D. 1964. In: *Photochemistry of proteins and nucleic acids*, Oxford : 29—87.
- Pullman B. and Pullman A. 1963. *Quantum biochemistry*. N. Y.—London. (Перевод: Пульман Б. и Пульман А. 1965. *Квантовая биохимия*. М.).

- Rahn R. O., Longworth Y. W., Eisenger J. and Shulman R. G. 1964. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **51**, 6 : 1299—1303.
- Rice S. A. and Doty P. 1957. J. Amer. Chem. Soc., **79** : 15.
- Shore V. G. and Pardee A. B. 1956. Arch. Biochem. Biophys., **60**, 1 : 100—107.
- Steiner R. F. and Beers R. F. 1958. J. Polymer Sci., **31**, 122 : 53—66.
- Stimson M. M. and Renter M. A. 1941. J. Amer. Chem. Soc., **63**, 3 : 697—699.
- Tsuboi M., Kyogoku Y. and Shimanouchi T. 1962. Biochim. Biophys. Acta, **55** : 1—12.
- Udenfriend S. 1962. Fluorescence assay in biology and medicine. N. Y.—London.
- Udenfriend S. and Zaltzman P. 1962. Ann. Biochem., **3**, 1 : 49—59.
- Udenfriend S., Zaltzman Nirenberg P. and Cantonì G. L. 1963. Ann. Biochem., **5**, 3 : 258—260.
- Vocet D., Gratzer W. B., Cox R. A. and Doty P. 1963. Biopolymers, **1**, 3 : 193—208.
- Walaas E. 1963. Acta Chem. Scand., **17**, 2 : 461—463.
- Watanabe S., Evenson L. and Culz V. 1963. J. Biol. Chem., **238**, 1 : 324—327.
- Weber G. 1957. Nature, **180**, 4599 : 1409.

К главе 3

- Агроскин Л. С., Королев Н. В., Кулаев И. С. и Помощникова Н. А. 1961. ДАН СССР, **131**, 6 : 1440—1443.
- Аленцев М. Н. и Винокуров Л. А. 1951. Изв. АН СССР, Сер. физ., **15**, 6 : 725—729.
- Баренбойм Г. М. 1963а. Взаимодействие кислорода с молекулами ароматических аминокислот, белков и нуклеиновых кислот в возбужденном синглетном состоянии. Автореф. дисс., Л.
- Баренбойм Г. М. 1963б. Биофизика, **8**, 2 : 154—163.
- Баренбойм Г. М. и Доманский А. Н. 1963. Биофизика, **8**, 3 : 321—329.
- Баренбойм Г. М. и Мочалкин А. И. 1966. Радиобиология, **6**, 5 : 671—674.
- Беликова Т. П. 1959. Оптика и спектроскопия, **6**, 1 : 117—118.
- Брумберг Е. М. и Барский И. Я. 1960. Цитология, **2**, 3 : 318—324.
- Владимиров Ю. А. и Конев С. В. 1959. Биофизика, **4**, 5 : 533—540.
- Галанин М. Д. и Чижикова З. А. 1961. Оптика и спектроскопия, **11**, 2 : 271—272.
- Дубинин Н. П. 1961. Проблемы радиационной генетики. М.
- Жижина Г. П., Круглякова Г. Е. и Эмануэль Н. М. 1965. В сб.: Управляемый биосинтез и биофизика популяций, Тез. докл., Красноярск : 144.
- Карякин А. В. 1961. Успехи химии, **30**, 8 : 1050—1068.
- Килин С. Ф., Михелашвили М. С. и Розман И. М. 1964. Оптика и спектроскопия, **16**, 4 : 663—673.
- Килин С. Ф. и Розман И. М. 1963. Оптика и спектроскопия, **15**, 4 : 494—499.
- Кузин А. М. 1958. В сб.: Радиобиология, М. : 3—13.
- Мочалкин А. И. 1965. В кн.: Сборник трудов по агрономической физике, Л., **12**.
- Нелипа Н. Ф. 1960. Введение в теорию многократного рассеяния частиц. М.
- Пшежецкий С. Я. 1962. Механизм радиационно-химических реакций. М.
- Розман И. М. и Килин С. Ф. 1959. Успехи физ. наук, **69**, 3 : 459—482

- Сапежинский И. И., Силаев Ю. В. и Донцова Е. Г. 1964. В сб.: Свободнорадикальные процессы в биологии, Тез. докл., М.: 47.
- Сапежинский И. И., Силаев Ю. В. и Эмануэль Н. М. 1963. ДАН СССР, 151, 3: 584—586.
- Сапежинский И. И., Силаев Ю. В. и Эмануэль Н. М. 1964. ДАН СССР, 159, 6: 1378—1380.
- Сапежинский И. И., Силаев Ю. В. и Эмануэль Н. М. 1965. В сб.: Биоллюминесценция, М.: 102—105.
- Сапежинский И. И. и Эмануэль Н. М. 1960. ДАН СССР, 131, 5: 1168—1170.
- Тарусов Б. Н. 1955. Основы биологического действия радиоактивных излучений. М.
- Теренин А. Н. 1947. Фотохимия красителей. М.
- Чижикова З. А. 1961. Тр. Физ. инст. АН СССР, 15: 178—229.
- Шехтман Я. Л. 1960. В кн.: Роль перекисей и кислорода в начальных стадиях радиобиологического эффекта, М.: 116—135.
- Щепотьева Е. С., Ардашников С. Н., Лурье Г. Е. и Рахманова Т. Б. 1959. Кислородный эффект при действии ионизирующих излучений. М.
- Эйдус Л. Х. 1964. В сб.: Основы радиационной биологии, М.: 11—42.
- Эмануэль Н. М., Круглякова К. Е., Жижина Г. П., Вичутинский А. А. и Васильев Р. Ф. 1965. В сб.: Биоллюминесценция, М.: 119—121.
- Augenstein L. 1962. *Advances Enzymol.*, 24: 359—413.
- Augenstein L. 1963. In: *Progress in biophysics (Molecular biology)*, N. Y., 13: 1—58.
- Augenstein L., Brustad T. and Mason R. 1964. In: *Advances in radiation biology*, N. Y.—London, 1: 227—266.
- Augenstein L., Carter J., Nag-Chaudhuri J., Nelson D. and Vearger E. 1964. In: *Physical processes in radiation biology*, N. Y. — London: 73—89.
- Bacq Z. M. and Alexander P. 1961. *Fundamentals of radiobiology*. N. Y. (Перевод: Бак З. и Александер П. 1963. Основы радиобиологии. М.).
- Birks J. B. 1964. *The theory and practice of scintillation counting*. London—N. Y.
- Birks J. B., Braga C. L. and Lumby M. D. 1964. *Brit. J. Appl. Phys.*, 15, 4: 399—404.
- Buck W. L. 1960. *Trans. IRE PGNS*, 7, 2—3: 11—16.
- Burton M. 1960. *Radiation Res.*, Suppl. 2: 119.
- Carter J. G., Nelson D. R. and Augenstein L. G. 1965. *Arch. Biochem. Biophys.*, 111, 2: 270—282.
- Charlesby A. 1960. *Atomic radiation and polymers*. N. Y.—Paris. (Перевод: Чердаби А. 1962. Ядерные излучения и полимеры. М.).
- Debye P. and Edwards L. O. 1952. *Science*, 116, 3006: 143—144.
- Fano U. 1953a. *Nucleonics*, 11, 8: 8—12.
- Fano U. 1953b. In: *Symposium on radiobiology*, Oxford—London: 87—96. (Перевод: Фано У. 1955. В сб.: Радиобиология, М.: 23—35).
- Fano U. 1961. In: *Comparative effects of radiation*, N. Y.: 14—21.
- Gray L. H. 1955. *Actions chimiques et biologiques de radiations*. 1, Masson.
- Hart E. I. and Platzman R. L. 1961. In: *Mechanisms in radiobiology*, N. Y.—London: 93—258.
- Hine G. Y. and Brownell G. L. (ed.) 1956. *Radiation dosimetry*. N. Y. — London. (Перевод: Хайн Г. и Брунелл Г. 1958. Радиационная дозиметрия. М.).
- Howard-Flanders P. 1957. *Nature*, 180, 4596: 1191—1192.
- Howard-Flanders P. and Jockey P. 1960. *Radiation Res.*, 13, 3: 466—478.

- Kallman H. and Furst M. 1958. In: Scintillation counting, N. Y.—Paris. 3—23.
- Kallman H., Kramer B. and Sucov E. 1955. J. Chem. Phys., 23 : 1043.
- Kasha M. 1960. Radiation Res., Suppl. 2 : 243—275.
- Kasha M. 1964. In: Physical processes in radiation biology, N. Y.—London : 90—92.
- Kihlman B. A. 1958. Exptl. Cell Res., 14, 3 : 639—642.
- Kohnlein N. a. Müller A. 1962. Phys. Med. Biol., 6, 3 : 599—604.
- Kuppermann A. and Raff L. M. 1964. In: Physical processes in radiation biology, N. Y.—London : 161—182.
- Lea D. E. 1959. Action of radiations on living cells. Cambridge. (Перевод: Ли Д. Е. 1963. Действие радиации на живые клетки. М.).
- Liebson S. H., Bishop M. E. and Elliot J. O. 1950. Phys. Revs., 80 : 907—999.
- Lipsky S. 1964. In: Physical processes in radiation biology, N. Y.—London : 215—232.
- Mason R. 1959. Discus. Faraday Soc., 27 : 129—133.
- Morrison P. 1952. In: Symposium on radiobiology, Oxford—London : 53—71. (Перевод: Моррисон П. 1955. В сб.: Радиобиология, М. : 7—22).
- O'Dwyer M. F., El-Bayoumi M. A. and Strickler S. V. 1962. J. Chem. Phys., 36, 5 : 1395—1396.
- Platzmann R. L. and Frank J. 1958. In: Information theory in biology, London—N. Y. (Перевод: Плацман Р. Л. и Франк Дж. 1960. В сб.: Теория информации в биологии, М. : 259—272).
- Pollard E. C., Quild W. R., Hutchinson F. and Setlow R. B. 1955. In: Progress in biophysics and biophysical chemistry, London—N. Y., 5 : 72—108.
- Powers E. L., Welb R. B. and Ehret C. F. 1960. Radiation Res., Suppl. 2 : 94—121.
- Reid C. 1957. Excited states in chemistry and biology. London. (Перевод: Рид С. 1960. Возбужденные электронные состояния в химии и биологии. М.).
- Schram E. 1963. Organic scintillation detectors. Amsterdam.
- Setlow R. 1958. Radiation Res., 9, 1 : 179—180.
- Setlow R., Watts G., Douglas C. 1959. In: Proc. I Nat. biophys. congr., New Haven : 174—183.
- Sommermeier K., Birkwald V. B. und Prütz W. 1961. Strahlentherapie, 116, 3 : 354—363.
- Teale F. W. Y. and Weber G. 1957. Biochem. J., 65, 3 : 476—482.
- Williams N. T. and Essex H. 1949. J. Chem. Phys., 17, 10 : 995—997.
- Yeagers E. and Augenstein L. 1965. Biophys. J., 5, 5 : 687—696.
- Zimmer K. G. 1961. Studies on quantitative radiation biology. Edinburgh—London. (Перевод: Циммер К. Г. 1962. Проблемы клеточной радиобиологии. М.).

К главе 4

- Агавердиев А. Ш., Доскоч Я. Е. и Тарусов Б. Н. 1965а. Биофизика, 10, 5 : 832—836.
- Агавердиев А. Ш., Доскоч Я. Е. и Тарусов Б. Н. 1965б. ДАН СССР, 163, 4 : 991—993.
- Агавердиев А. Ш. и Тарусов Б. Н. 1965. Биофизика, 10, 2 : 351—352.
- Аллабутаев К. А., Васильев Р. Ф., Вичутинский А. А. и Русина И. Ф. 1965. В сб.: Биолуминесценция, М. : 8—18.

- Баренбойм Г. М. 1963. Взаимодействие кислорода с молекулами ароматических аминокислот, белков и нуклеиновых кислот в возбужденном синглетном состоянии. Автореф. дисс., Л.
- Баренбойм Г. М. 1966. В сб.: Руководство по цитологии, М.—Л., 2: 126—137.
- Березин И. В., Денисов Е. Т. и Эмануэль Н. М. 1962. Окисление циклогексана. М.
- Бреслер С. Е. 1963. Введение в молекулярную биологию. М.—Л.
- Брумберг Е. М. и Барский И. Я. 1960. Цитология, 2, 3: 318—234.
- Брумберг Е. М., Мейсель М. Н., Барский И. Я., Зеленин А. В. и Ляпунова Е. А. 1961. ДАН СССР, 141, 3: 723—725.
- Васильев Р. Ф. 1964а. Люминесценция при химических реакциях в растворах. Автореф. дисс., Л.
- Васильев Р. Ф. 1964б. Природа, 12: 22—30.
- Васильев Р. Ф. 1965а. Оптика и спектроскопия, 18, 2: 236—244.
- Васильев Р. Ф. 1965б. Оптика и спектроскопия, 18, 3: 415—421.
- Васильев Р. Ф. 1965в. В сб.: Биоллюминесценция, М.: 198—202.
- Веденеев В. И., Гурвич Л. В., Кондратьев В. Н., Медведев В. А. и Франкевич Е. Л. 1962. Энергии разрыва химических связей. Потенциалы ионизации и средство к электрону. М.
- Веселовский В. А., Секамова Е. Н. и Тарусов Б. Н. 1963. Биофизика, 8, 1: 125—127.
- (Владимиров Ю. А.) Vladimirov Y. A. 1965. Photochem. and Photobiol., 4, 3: 369—384.
- Владимиров Ю. А., Аксенцев С. Л. и Оленев В. И. 1965. Биофизика, 10, 4: 614—618.
- Владимиров Ю. А. и Литвин Ф. Ф. 1959. Биофизика, 4, 5: 601—604.
- Владимиров Ю. А. и Литвин Ф. Ф. 1965. В сб.: Биоллюминесценция, М.: 51—59.
- Владимиров Ю. А., Литвин Ф. Ф. и Тань Мань-ци. 1962. Биофизика, 7, 6: 675—682.
- Владимиров Ю. А. и Львова О. Ф. 1964. Биофизика, 9, 4: 506—507.
- Владимиров Ю. А. и Львова О. Ф. 1965. В сб.: Управляемый биосинтез и биофизика популяций, Тез. докл., Красноярск: 150.
- Волькенштейн М. В. 1964. В сб.: Молекулярная биология. Проблемы и перспективы, М.: 172—181.
- Гасанов Р. А. и Мамедов Т. Г. 1963. Научн. докл. высшей школы, Биол. науки, 3: 88—92.
- Гасанов Р. А., Мамедов Т. Г. и Тарусов Б. Н. 1963а. ДАН СССР, 150, 4: 913—915.
- Гасанов Р. А., Мамедов Т. Г. и Тарусов Б. Н. 1963б. ДАН СССР, 153, 4: 947—949.
- Гительзон И. И., Фиш А. М. и Чумакова Р. И. 1965. В сб.: Управляемый биосинтез и биофизика популяций, Тез. докл., Красноярск: 153.
- Гительзон И. И. и Чумакова Р. И. 1965. В сб.: Управляемый биосинтез и биофизика популяций, Тез. докл., Красноярск: 152.
- Гительзон И. И., Чумакова Р. И. и Фиш А. М. 1965. Биофизика, 10, 1: 100—104.
- Гриппберг А. А. 1920. Журн. Русск. физ.-хим. общ., 52, 4—5—6: 151—185.
- Гурвич А. А. 1960. Бюлл. экспер. биол. и мед., 49, 5: 482—485.
- Гурвич А. А. 1961. Бюлл. экспер. биол. и мед., 51, 5: 68—73.
- Гурвич А. А. 1964. Бюлл. Моск. о-ва испыт. природы, Отд. биол., 69, 6: 145.
- Гурвич А. А. 1965. Биофизика, 10, 4: 619—624.

- Гурвич А. А. и Еремеев В. Ф. 1965. В сб.: Биоллюминесценция, М. : 135—142.
- (Гурвич А. А., Еремеев В. Ф. и Карабчиевский Ю. А.) Gurwitch A. A., Eremeev W. F. and Karabtchiewski U. A. 1965. *Nature*, 206, 4979 : 20—22.
- (Гурвич А. Г.) Gurwitsch A. G. 1959. *Die Mitogenetische Strahlung*. Jena.
- Гурвич А. Г. и Гурвич Л. Д. 1934. Митогенетическое излучение. Л.
- Гурвич А. Г. и Гурвич Л. Д. 1947. В кн.: Сборник работ по митогенезу и теории биологического поля, М. : 5—20, 120—130.
- Гурвич А. Г. и Гурвич Л. Д. 1948. Введение в учение о митогенезе. М.
- Гусар Д. Н., Старинкин Ю. А. и Белова Н. Г. 1965. В сб.: Физико-математические методы исследования в биологии и медицине, Тез. докл., Новосибирск : 46.
- Еремеев В. Ф. 1961. Бюлл. экспер. биол. и мед., 51, 4 : 102—106.
- Жижина Г. П., Круглякова Г. Е. и Эмануэль Н. М. 1965. В сб.: Управляемый биосинтез и биофизика популяций, Тез. докл., Красноярск : 144.
- Журавлев А. И. 1959. Лучевое воздействие на липиды и липидная модель профилактического эффекта. Автореф. дисс., М.
- Журавлев А. И. 1965а. В сб.: Биоллюминесценция, М. : 184—193.
- Журавлев А. И. 1965б. Журн. общ. биол., 26, 2 : 129—137.
- Журавлев А. И. и Веселовский В. А. 1963. Живое свечение. М.
- Журавлев А. И., Веселовский В. А. и Кощенко Н. Н. 1965. В сб.: Биоллюминесценция, М. : 19—50.
- Журавлев А. И., Поливода А. И. и Тарусов Б. Н. 1961. Радиобиология, 1, 3 : 321—324.
- Журавлев А. И., Филиппов Ю. Н. и Симонов В. В. 1964. Биофизика, 9, 6 : 671—677.
- Журавлев А. И., Филиппов Ю. Н. и Симонов В. В. 1965а. В сб.: Биоллюминесценция, М. : 75—89.
- Журавлев А. И., Филиппов Ю. Н. и Симонов В. В. 1965б. Биофизика, 10, 2 : 246—251.
- Залкинд С. Я. 1937а. Успехи соврем. биол., 7, 1 : 50—66.
- Залкинд С. Я. 1937б. Успехи соврем. биол., 7, 2 : 216—233.
- Залкинд С. Я. 1964. Бюлл. Моск. общ. испыт. природы, отд. биол., 69, 6 : 145—146.
- Иванов И. И. и Петрусович Ю. М. 1965. Научн. докл. высшей школы, Биол. науки, 3 : 81—82.
- Исмаилова С. Х., Козлов Ю. П. и Гасанов Р. А. 1965. В сб.: Физико-химические основы авторегуляции в клетках, Тез. докл., М. : 19—20.
- Казначеев В. П. 1965. В сб.: Физико-математические методы исследования в биологии и медицине, Тез. докл., Новосибирск : 38—41.
- Казначеев В. П., Артемьев В. В., Голдобин А. С., Гуськов А. Н., Каменская В. В. и Куликова Л. А. 1965. В сб.: Физико-математические методы исследования в биологии и медицине, Тез. докл., Новосибирск : 34—35.
- Казначеев В. П., Иванов Г. К., Каменская В. В., Казанина С. С., Кузнецов П. Г., Набиулин М. С., Субботин М. Я. и Якобсон Г. С. 1965. В сб.: Управляемый биосинтез и биофизика популяций, Тез. докл., Красноярск : 152.
- Казначеев В. П., Каменская В. В., Куликова Л. А., Старинкин Ю. А., Куликов В. Ю., Набиулин М. С. и Гусар Д. Н. 1965. В сб.: Физико-математические методы исследования в биологии и медицине, Тез. докл., Новосибирск : 36—37.
- Казначеев В. П., Кузнецов П. Г. и Субботин М. Я. 1964. В сб.: Механизмы склеротических процессов и рубцевания, Новосибирск : 49—61.

- Казначеев В. П., Куликова Л. А. и Старинкин Ю. А. 1965. В сб.: Физико-математические методы исследования в биологии и медицине, Тез. докл., Новосибирск : 44.
- Катибников М. А. и Конев С. В. 1962. Биофизика, 7, 2 : 150—153.
- Клипсон Н. А., Мамедов Т. Г. и Тарусов Б. Н. 1965. В сб.: Биоллюминесценция, М. : 107—111.
- Конев С. В. и Катибников М. А. 1961. Биофизика 6, 6 : 638—644.
- Конев С. В. и Катибников М. А. 1965. В сб.: Биоллюминесценция, М. : 69—74.
- Конев С. В. и Лыскова Т. И. 1964. В сб.: Биологическое действие ультрафиолетового излучения, Тез. докл., М. : 83.
- Конев С. В., Лыскова Т. И. и Нисенбаум Г. Д. 1965. В сб.: Управляемый биосинтез и биофизика популяций, Тез. докл., Красноярск : 150—151.
- Конев С. В., Троицкий Н. А. и Катибников М. А. 1961. В сб.: Тр. V Междунар. биохим. конгр., рефераты секц. сообщ., М., 2 : 35—36. (См. также отд. оттиск: Конев С. В., Троицкий Н. А. and Kati b n i k o v M. A. 1961. V Internat. Biochem. Congress. Minsk).
- Красновский А. А. 1963. В сб.: Биоллюминесценция, Тез. докл., М. : 16—17.
- Кузнецов А. Н. и Кукушкин А. К. 1965. В сб.: Управляемый биосинтез и биофизика популяций, Красноярск : 144.
- Кулин Е. Т. 1960. ДАН СССР, 4, 2 : 78—81.
- Кулин Е. Т. 1965. В сб.: Биоллюминесценция, М. : 196—197.
- Литвин Ф. Ф., Владимиров Ю. А. и Красновский А. А. 1960. Успехи физ. наук, 71, 1 : 149—155.
- Лихтенштейн Г. И. и Пурмаль А. П. 1965. В сб.: Управляемый биосинтез и биофизика популяций, Тез. докл., Красноярск : 186.
- Лущик Ч. Б. 1955. Исследование центров захвата в щелочно-галоидных кристаллофосфорах. Тарту.
- Мамедов Т. Г. 1965. В сб.: Физико-химические основы авторегуляции в клетках. Тез. докл., М. : 32.
- Мкртчян Р. Г., Закарян А. Е., Петросян Э. П., Коваленко Т. А. и Гарибян Д. В. 1965. В сб.: Физико-химические основы авторегуляции в клетках, Тез. докл., М. : 34.
- Моисеева М. Н. 1960а. Укр. бот. журн., 17, 4 : 29—35.
- Моисеева М. Н. 1960б. Митогенетические лучи и митогенетические методы. Автореф. дисс. Киев.
- Мочалкин А. И. 1965. В кн.: Сборник трудов по агрономической физике, Л., 12.
- Петрусович Ю. М. и Иванов И. И. 1965. Биофизика, 10, 4 : 698—699.
- Петрусович Ю. М., Иванов И. И. и Тарусов Б. Н. 1965. В сб.: Физико-химические основы авторегуляции в клетках, Тез. докл., М. : 17.
- Петрусович Ю. М. и Конопляников А. Г. 1965. Биофизика, 10, 3 : 524—525.
- Попов Г. А. 1964. О применении хемиллюминесцентного метода для изучения индуцированных окислительных реакций в биосубстрате в зависимости от степени его повреждения. Автореф. дисс., М.
- Попов Г. А. и Тарусов Б. Н. 1963. Биофизика, 8, 3 : 317—320.
- Попов Г. А. и Тарусов Б. Н. 1964. Биофизика, 9, 4 : 528—529.
- Пятенко В. С. и Тарусов Б. Н. 1964. Биофизика, 9, 1 : 134—135.
- Родионов С. Ф. и Франк Г. М. 1934. Вопросы светобиологии и измерения света. М.

- Рощупкин Д. И. 1965. Исследование первичных фотохимических процессов в белках и ароматических аминокислотах. Автореф. дисс., М.
- Рощупкин Д. И. и Владимиров Ю. А. 1964. В сб.: Биологическое действие ультрафиолетового излучения, Тез. докл., М.: 90.
- Рощупкин Д. И. и Владимиров Ю. А. 1965а. Журн. прикл. спектроскопии, 3, 3: 254—260.
- Рощупкин Д. Н. и Владимиров Ю. А. 1965б. Биофизика, 10, 1: 48—55.
- Сапежинский И. И. и Силаев Ю. В. 1965а. ДАН СССР, 162, 3: 691—693.
- Сапежинский И. И. и Силаев Ю. В. 1965б. В сб.: Управляемый биосинтез и биофизика популяций, Тез. докл., Красноярск: 143—144.
- Сапежинский И. И., Силаев Ю. В. и Донцова Е. Г. 1964. В сб.: Свободнорадикальные процессы в биологии, Тез. докл., М.: 47.
- Сапежинский И. И., Силаев Ю. В. и Донцова Е. Г. 1965. Биофизика, 10, 3: 429—432.
- Сапежинский И. И., Силаев Ю. В. и Эмануэль Н. М. 1963. ДАН СССР, 151, 3: 584—586.
- Сапежинский И. И., Силаев Ю. В. и Эмануэль Н. М. 1964. ДАН СССР, 159, 6: 1378—1380.
- Сапежинский И. И., Силаев Ю. В. и Эмануэль Н. М. 1965. В сб.: Биоллюминесценция, М.: 102—105.
- Сапежинский И. И. и Эмануэль Н. М. 1965. В сб.: Биоллюминесценция, М.: 122—124.
- Свешников Б. Я. 1941. Природа, 2: 15—30.
- Сизов М. И. 1917. Живой свет. Петроград.
- Смирнов В. Н., Куллыев П., Варшавский Я. М. и Спирин А. С. 1964. ДАН СССР, 156, 5: 1221—1224.
- Тарасов Н. И. 1956. Свечение моря. М.
- Тарусов Б. Н. и Журавлев А. И. 1965. В сб.: Биоллюминесценция, М.: 125—132.
- Тарусов Б. Н., Козлов Ю. П., Уртилэ С. и Чжоу Юн-цзен. 1965. ДАН СССР, 163, 3: 752—753.
- Тарусов Б. Н., Поливода А. И. и Журавлев А. И. 1961а. Биофизика, 6, 4: 490—491.
- Тарусов Б. Н., Поливода А. И. и Журавлев А. И. 1961б. Радиобиология, 1, 1: 150—151.
- Тарусов Б. Н., Поливода А. И., Журавлев А. И. и Секамова Е. Н. 1962. Цитология, 4, 6: 696—699.
- Троицкий Н. А., Конев С. В. и Катибников М. А. 1961. Биофизика, 6, 2: 238—239.
- Тумерман Л. А. 1962. Изв. АН СССР, Сер. физ., 26, 1: 84—93.
- Тумерман Л. А., Завильгельский Г. Б. и Иванов В. И. 1962. Биофизика, 7, 2: 21.
- Тумерман Л. А. и Федорович И. Б. 1965. В сб.: Управляемый биосинтез и биофизика популяций, Тез. докл., Красноярск: 149.
- Тхор Л. Ф. и Козлов Ю. П. 1965. Биофизика, 10, 3: 523—524.
- Фиш А. М., Саланский Н. М. и Чумакова Р. И. 1965. В сб.: Биоллюминесценция, М.: 177—180.
- Фиш А. М., Чумакова Р. И. и Саланский Н. М. 1965. В сб.: Управляемый биосинтез и биофизика популяций, Тез. докл., Красноярск: 153.
- Чумакова Р. И. 1963а. Изв. СО АН СССР, Сер. биол.-мед. наук, 2: 62—67.
- Чумакова Р. И. 1963б. Взаимоотношение люминесцентной реакции бактерий с некоторыми сторонами их метаболизма. Автореф. дисс., Красноярск.

- Чумакова Р. И. и Егорова А. Л. 1964а. Микробиология, **33**, 3 : 423—427.
- Чумакова Р. И. и Егорова А. Л. 1964б. Микробиология, **33**, 4 : 639—642.
- Шимкевич В. 1923. Биологические основы зоологии, **1**. Москва—Петроград.
- Эмануэль Н. М., Круглякова К. Е., Жижина Г. П., Вичутинский А. А. и Васильев Р. Ф. 1965. В сб.: Биоллюминесценция, М. : 119—121.
- Arnold W. and Sherwood H. K. 1957. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **43**, 1 : 105—114.
- Audubert R. 1938. Angew. Chemie, **51**, 11 : 153—163. (Перевод: О д ю б е р Р. 1938. Успехи химии, **7**, 12 : 1858—1884).
- Audubert R. 1939. Trans. Faraday Soc., **35**, 213 : 197—204.
- Augenstein L. G., Carter J. G., Nelson D. R. and Yockey H. P. 1960. Radiation Res., Suppl., **2** : 19—48.
- Augenstein L. G., Carter J. G., Nelson D. R. and Yockey H. P. 1961. In: Free radicals in biological systems, N. Y.—London : 149—156. (Перевод: О ж е н с т и н Л. Г., К а р т е р Дж. Г., Н е л с о н Д. Р. и Й о к к и Г. П. 1963. В сб.: Свободные радикалы в биологических системах, М. : 186—194).
- Barth H. 1936. Biochem. Z., **285**, 5—6 : 311—339.
- Becher O. 1957. Biol. Zbl., **76**, 2 : 141—147.
- Bitler B. and McElroy W. 1957. Arch. Biochem. Biophys., **72**, 2 : 358—368.
- Bruckner B. H. 1964. Radiation Res., **22**, 1 : 171—172.
- Brugger J. E. and Franck I. 1958. Rev. Biochem. Biophys., **75**, 2 : 465—496.
- Buck J. B. 1961. In: Light and life, Baltimore : 754—770.
- Buck J. B. and Case I. F. 1961. In: Light and life, Baltimore : 754—770.
- Bull H. B. 1947. Physical biochemistry. N. Y.—London. (Перевод: Булл Г. Б. 1949. Физическая биохимия. М.).
- Burns C. H., Jacobson A. P. and Whipple G. H. 1965. Radiation Res., **24**, 3 : 494—502.
- Burns C. H., Nevill A. D. and Whipple G. H. 1962. Science, **135**, 3502 : 430—432.
- Burns C. H. and Whipple G. H. 1964. Radiation Res., **22**, 1 : 173.
- Carter J. G., Nelson D. R. and Augenstein L. G. 1963. Appl. Phys. Letters, **2**, 11 : 226—227.
- Chase A. M. 1964. In: Photophysiology. N. Y.—London : 389—421.
- Clarke W. G. 1963. Nature, **198**, 4887 : 1244—1246.
- Colli L. and Facchini U. 1954. Nuovo Cimento, **12**, 1 : 150.
- Colli L., Facchini U. and Rossi A. 1954. Nuovo Cimento, **11**, 3 : 255.
- Colli L., Facchini U., Guidotti G., Dugnani Lonati R., Orsenigo M. and Sommariva O. 1955. Experientia, **11**, 12 : 479—481.
- Cormier M. J. 1961. In: Light and life, Baltimore : 274—293.
- Cormier M. J. and Dure L. S. 1963. J. Biol. Chem., **238**, 2 : 785—789.
- Cormier M. J. and Totter I. R. 1964. In: Annual Rev. Biochem., **33** : 431—458.
- De Luca M. and McElroy W. D. 1965. Biochem. Biophys. Res. Commun., **18**, 5—6 : 836—842.
- De Luca M., Wirtz G. W. and McElroy W. D. 1964. Biochemistry, **3**, 7 : 935—939.
- Debay P. and Edwards J. O. 1952. Science, **116**, 3006 : 143—144.
- Douzou P., Franq J., Hanns M. and Ptak M. 1961. J. Chim. Phys. et Phys-Chim. Biol., **58**, 10 : 926—933.
- Dure L. S. and Cormier M. J. 1963a. J. Biol. Chem., **238**, 2 : 790—793.

- Dure L. S. and Cormier M. J. 1963b. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **11**, 6 : 489—495.
- Dure L. S. and Cormier M. J. 1964. *J. Biol. Chem.*, **239**, 7 : 2351—2359.
- Eley D. 1962. In: *Horizons of biochemistry*, N. Y.—London : 341—380. (Перевод: Эли Д. 1964. В сб.: Горизонты биохимии, М.: 261—292).
- Galston A. W. 1950. *Science*, **111**, 2893 : 619—624.
- Gauroy P. and Grive J. 1964. *La nature*, 3347 : 98—104.
- Gawronski E. 1961. *Ann. Univ. Mariae Curie-Sklodowska, Sect. C. Biol.*, **14** (19) : 407—433.
- Gibson Q. H. and Hastings J. W. 1962. *Biochem. J.*, **83**, 2 : 368—377.
- Giese A. 1957. *Cell physiology*. Philadelphia—London. (Перевод: Гизе А. 1959. Физиология клетки. М.).
- Gill J. E. 1963. *Dissert. Abstr.*, **24**, 1 : 354.
- Gill J. E. and Weissbluth M. 1964. *Biopolymers*, Symp. 1. Quantum aspects of polypeptides and polynucleotides, N. Y.: 433—439.
- Green A. and McElroy W. D. 1956. *Biochim. Biophys. Acta*, **20**, 1 : 170—176.
- Harvey E. N. 1940. *Living light*. New Jersey.
- Harvey E. N. 1952. *Bioluminescence*. N. Y.
- Hastings J. W., Rilwy W. H. and Massa J. 1965. *J. Biol. Chem.*, **240**, 3 : 1473—1781.
- Hercules D. M. 1964. *Science*, **145**, 3634 : 808—809.
- Hirata Y., Shimomura O. and Eguchi S. 1959. *Tetragedron letters*, 5 : 4—9.
- Hollander A. 1960. *Quart. Rev. Biol.*, **35**, 3 : 246—247.
- Johnson F. H. (ed.) 1955. *Luminescence in biological system*. Washington.
- Johnson F. H., Eyring H. and Chang J. J. 1959. *Discus Faraday Soc.*, **27** : 191—199.
- Johnson F. H., Shimomura O., Saiga Y., Gershman L. C., Reynolds G. T. and Waters I. R. 1962. *J. Cellular and Compar. Physiol.*, **60**, 1 : 85—103.
- Johnson F. H., Sie E. H.-C. and Haneda Y. 1961. In: *Light and life*, Baltimore : 206—218.
- Karakashian M. W. and Hastings J. W. 1962. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **48**, 12 : 2130—2137.
- Karakashian M. W. and Hastings J. W. 1963. *J. Gen. Physiol.*, **47**, 1 : 1—12.
- Kimball R. F. 1955. In: *Radiation biology*. N. Y., 2 : 285—314.
- Korten E. 1964. *Chemiker-Ztg.*, **88** : 385—388.
- Kuwabara S., Cormier M. Y., Dure L. S., Kreiss P. and Pfuender P. 1965. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **53**, 4 : 822—828.
- Kuwabara S., Kreiss P. and Cormier M. 1964. *Federat. Proc.*, **23**, 2, part 1 : 163.
- Lehninger A. L. 1964. *The mitochondrion*. N. Y.—Amsterdam.
- Lippincott S. C., Schoof C. Y. and Lawton A. H. 1964. *Federat. Proc.*, **23**, 2, part 1 : 213.
- Lohmann W., Fowler C. F. and Perkins W. H. 1963. *Acta Radiol.*, **1**, 3 : 183—189.
- Lohmann W., Fowler C. F. and Perkins W. H. 1964. *Acta Radiol.*, **2**, 1 : 17—23.
- Masterson T. S., Mason A. D. and Brown W. L. 1964. *Amer. J. Med. Electron.*, **3**, 4 : 283—285.
- McElroy W. D. 1960. *Federat. Proc.*, **19**, 4, part 1 : 941—948.
- McElroy W. D. 1961. In: *Bacteria*, N. Y., 2 : 479—508. (Перевод: Мак-Элрой В. Д. 1963. В кн.: Метаболизм бактерий, М.: 464—490).
- McElroy W. D. 1962. In: *Enzymes*, N. Y., 6 : 433—442.
- McElroy W. D. 1963a. In: *Methods in enzymology*, N. Y.—London, **6** : 775—777.

- McElroy W. D. 1963b. In: *Methods in enzymology*, N. Y.—London, 6 : 445—448.
- McElroy W. D. and Seliger H. H. 1961. In: *Light and life*, Baltimore : 249—257.
- McElroy W. D. and Seliger H. H. 1962a. *Scient. Amer.*, 207, 6 : 76—89.
- McElroy W. D. and Seliger H. H. 1962b. In: *Horizons in biochemistry*, N. Y.—London : 91—101. (Перевод: Мак-Элрой В. Д. и Селиджер Г. Г. 1964. В сб.: Горизонты биохимии, М. : 74—82).
- McElroy W. D. and Seliger H. H. 1962c. *Federat. Proc.*, 21, 6 : 1006—1012.
- (McElroy W. and Seliger H.) Мак-Элрой В. и Селиджер Г. 1962d. В сб.: Тр. V Междунар. биохим. конгр., Симп. 3, Эволюц. биохимия, М. : 161—171.
- McElroy W. D. and Seliger H. H. 1963. In: *Advances in enzymology*, N. Y.—London, 25 : 119—166.
- McElroy W. D. and Strehler B. L. 1954. *Bacteriol. Revs*, 18, 2 : 177—194.
- Nicol J. A. C. 1960. *The biology of marine animals*. N. Y.
- Nicol J. A. C. 1962. In: *Adv. Compar. and Physiol. Biochem.*, N. Y.—London, 1 : 217—273.
- Nicol J. A. C. 1963. *Endeavour*, 22, 85 : 37—41.
- Nilsson R. 1964. *Acta Chem. Scand.*, 18, 2 : 389—401.
- Prydz H. and Froeholm L. O. 1964. *Acta Chem. Scand.*, 18, 2 : 554—556.
- Prydz S. and Rogeberg T. 1964. *Phys. Norveg.*, 1, 4 : 227—333.
- Pullman B. and Pullman A. 1963. *Quantum biochemistry*. N. Y.—London. (Перевод: Пульман Б. и Пульман А. 1963. Квантовая биохимия, М.).
- Reid C. 1957. *Excited states in chemistry and biology*. London. (Перевод: Рид С. 1960. Возбужденные электронные состояния в химии и биологии, М.).
- Reinstoff E. 1960. *Erfahrungsheilkunde*, 9, 11 : 521—528.
- Rhodes W. C. and McElroy W. D. 1958a. *Science*, 128, 3318 : 253—254.
- Rhodes W. C. and McElroy W. D. 1958b. *J. Biol. Chem.*, 233, 6 : 1528—1537.
- Rogers P. and McElroy W. 1958a. *Arch. Biochem. Biophys.*, 75, 1 : 87—105.
- Rogers P. and McElroy W. 1958b. *Arch. Biochem. Biophys.*, 75, 1 : 106—116.
- Russel G. 1957. *J. Amer. Chem. Soc.*, 79, 14 : 3871—3877.
- Seliger H. H. and McElroy W. D. 1960. *Arch. Biochem. Biophys.*, 88, 1 : 136—141.
- Seliger H. H. and McElroy W. D. 1964. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 52, 1 : 75—81.
- Shimomura O. 1964. *Shizen*, 19, 2 : 47—51.
- Shimomura O., Goto T. and Hirata V. 1957. *Bull. Chem. Soc. Japan*, 30, 8 : 929—933.
- Shimomura O., Johnson F. H. and Saiga Y. 1962a. *Federat. Proc.*, 21, 2, pt. 2 : 401.
- Shimomura O., Johnson F. H. and Saiga Y. 1962b. *J. Cellular and Compar. Physiol.*, 59, 3 : 223—239.
- Shimomura O., Johnson F. H. and Saiga Y. 1963a. *J. Cellular and Compar. Physiol.*, 62, 1 : 1—8.
- Shimomura O., Johnson F. H. and Saiga Y. 1963b. *J. Cellular and Compar. Physiol.*, 62, 1 : 9—15.
- Shimomura O., Johnson F. H. and Saiga Y. 1963c. *Science*, 140, 3573 : 1339—1340.

- Shinazo I. 1964. Gann (Jap. J. Cancer Res.), 55, 3 : 263—266.
- Siebert W. und Seffert H. 1936a. Biochem. Z., 287, 1—2 : 92—103.
- Siebert W. und Seffert H. 1936b. Biochem. Z., 287, 1—2 : 104—108.
- Sitko M. 1960. Sbor. Vysoké školy Zeměd. a Lesn. fac. v. Brně, B, 1 : 179—181.
- Slawinska D. i Slawinski S. 1964. Zesz. Nauk. Wyższej Szkoły Roln. W. Szczecinie, 15 : 142—145.
- Stauff J. und Reske G. 1964. Naturwissenschaften, 51, 2 : 39.
- Strehler B. L. 1951. Arch. Biochem. Biophys., 34, 2 : 239—248.
- Strehler B. L. and Arnold W. 1951. J. Gen. Physiol., 34, 6 : 809—820.
- Strehler B. L. and Cormier M. Y. 1954. J. Biol. Chem., 211 : 213—225.
- Terpstra W. 1962. Biochim. Biophys. Acta, 60, 3 : 580—590.
- Urbach F. 1930. Sitzungsber. Österr. Acad. Wiss. Math.-naturwiss. Kl., Abt. IIb, 139 : 353—362.
- Weinberg C. J., Nelson D. R., Cazier J. G. and Augenstein L. G. 1962. J. Chem. Phys., 36, 11 : 2869—2879.
- Westermarck T. and Grapendisser B. 1960. Nature, 188, 4748 : 395—396.
- White E. H., McCapra F., Field G. E. and McElroy W. D. 1961. J. Amer. Chem. Soc., 83, 10 : 2402—2403.
- White E. H., Wörther H., Field G. F. and McElroy W. D. 1965. J. Organ. Chem., 30, 7 : 2344—2347.
- Witting L. A. 1965. Federat. Proc., 24, 4 : 912—916.

К главе 5

- Авакян Ц. М., Аджян П. С. и Апалян Р. Р. 1963. Биофизика, 8, 4 : 385—386.
- Агроскин Л. С. 1957. Биофизика, 2, 4 : 518—519.
- Агроскин Л. С. и Королев Н. В. 1963. Приборы и техника эксперимента, 4 : 135—137.
- Александров О. В., Гофрен М. В., Кейлина Т. А. и Тверякина Р. И. 1965. Журн. прикл. спектроскопии, 2, 5 : 471—475.
- Артемьев В. В. 1964. Радиотехника и электроника, 9, 4 : 756—757.
- Баренбойм Г. М., Барский И. Я., Брумберг Е. М. и Пинто Р. И. 1962. Биофизика, 7, 3 : 351—356.
- Баренбойм Г. М., Доманский А. Н. и Соломатин В. Ф. 1964. В сб.: XIII совещ. по люминесценции, Тез. докл., М. : 8—9.
- Баренбойм Г. М., Доманский А. Н. и Соломатин В. Ф. 1966a. Приборы и техника эксперимента, 2 : 131—133.
- Баренбойм Г. М., Доманский А. Н. и Соломатин В. Ф. 1966b. В сб.: Промышленность химических реактивов. Серия технической и экономической информации, М., № 8 (14).
- Барский И. Я. и Якубенас В. А. 1964. В сб.: Электронная и флуоресцентная микроскопия клетки, М.—Л. : 164—168.
- Борисов А. Ю. 1960. Оптика и спектроскопия, 9, 1 : 115—116.
- Бурштейн Э. А. и Владимиров Ю. А. 1964. Биофизика, 9, 2 : 184—193.
- Ван дер Зил А. 1958. Флуктуация в радиотехнике и физике. М.
- Васильев Р. Ф. 1965. В сб.: Биолюминесценция, М. : 170—176.
- Васильев Р. Ф., Жучкова Т. Н. и Петухов С. М. 1963. Оптико-механическая промышленность, 3 : 2—3.
- Васильев Р. Ф., Карпухин О. Н. и Шляпинтох В. Я. 1961. Журн. физ. химии, 35, 2 : 461—462.
- Вильдгрубе Г. С., Далиненко Н. К., Дунаевская Н. В. и Ронкин Ж. М. 1963. Приборы и техника эксперимента, 5 : 167—172.

- Вильдгрубе Г. С. и Ронкин Ж. М. 1962. Приборы и техника эксперимента, 2 : 119—120.
- Вильдгрубе Г. С., Ронкин Ж. М. и Колосов Ю. А. 1964. Изв. АН СССР, Сер. физ., 28, 2 : 377—387.
- Владимиров Ю. А. и Литвин Ф. Ф. 1959. Биофизика, 3, 5 : 606—609.
- Владимиров Ю. А. и Литвин Ф. Ф. 1964. Фотобиология и спектральные методы исследования. М.
- Гавриленко Л. М., Лебедь Г. Г. и Назаров Д. А. 1962. Приборы и техника эксперимента, 3 : 193.
- Голланд М. И. 1961. Аппаратура для люминесцентного анализа. М.—Л.
- Голубева Г. И., Розенкранц С. А. и Гарина Л. П. 1965. Оптико-механическая промышленность, 4 : 1—6.
- Захаров И. В. и Шляниных В. Я. 1961. Кинетика и катализ, 2, 2 : 165—171.
- Казначеев В. П., Артемьев В. В., Голдобин А. С., Гуськов Л. Н., Каменская В. В. и Куликова Л. Н. 1965. В сб.: Физико-математические методы исследования в биологии и медицине, Тез. докл., Новосибирск : 34—35.
- Катибников М. А. и Конев С. В. 1961. Приборы и техника эксперимента, 4 : 166—169.
- Ковалева Т. А., Меламид А. Е., Писаревский А. Н., Резников И. В. и Шушкевич С. С. 1965. Приборы и техника эксперимента, 2 : 150—154.
- Конев С. В. и Катибников М. А. 1961. Биофизика, 6, 6 : 638—644.
- Константинова-Шлезингер М. А. (ред.) 1961. Люминесцентный анализ. М.
- Ксанфомалити Л. В. 1962. Приборы и техника эксперимента, 2 : 121—123.
- Лейтейзен Л. Г. и Глуховский Б. М. 1964. Изв. АН СССР, Сер. физ., 28, 1 : 115—117.
- Маршак И. С. 1962. Приборы и техника эксперимента, 3 : 5—22.
- Маршак И. С. 1963. Импульсные источники света. М.—Л.
- Матвеев В. В., Минаева Е. Е. и Соколов А. Д. 1962. Приборы и техника эксперимента, 1 : 144—148.
- Матвеев В. В. и Соколов А. Д. 1962. Фотоумножители в сцинтилляционных счетчиках. М.
- Мейер А. и Зейтц Э. 1952. Ультрафиолетовое излучение. М.—Л.
- Мекшенков М. И. и Андрейцев А. П. 1960. Биофизика, 5, 5 : 616—620.
- Моргулис Н. Д. и Дятловицкая Б. Н. 1940. Журн. техн. физ., 10, 2 : 657—660.
- Новиков И. П. и Янгигаев М. 1966. В сб.: Материалы I научной конференции молодых специалистов Института цитологии АН СССР, Л. : 43.
- Ошерович А. Л., Глуховский Б. М. и Шпаков И. С. 1962. Приборы и техника эксперимента, 1 : 149—154.
- Перцев А. Н., Писаревский А. Н. и Сошин Л. Д. 1963. Приборы и техника эксперимента, 5 : 173—176.
- Перцев А. Н., Писаревский А. Н. и Сошин Л. Д. 1964. Приборы и техника эксперимента, 3 : 132—135.
- Перцев А. Н., Писаревский А. Н. и Сошин Л. Д. 1965. Журн. прикл. спектроскопии, 2, 5 : 396—401.
- Ратнер Е. С. 1960. Оптика и спектроскопия, 9, 1 : 101—107.
- Родионов С. Ф. и Ошерович А. Л. 1950. ДАН СССР, 74, 3 : 461—464.
- Русинов Л. А. 1962. Приборы и техника эксперимента, 3 : 141—147.
- Скачков Ю. Ф. 1964. Приборы и техника эксперимента, 4 : 157—159.
- Сущинский М. М. 1950. Журн. эксперим. и теорет. физ., 20, 4 : 304—317.

- Тарусов В. Б., Поливода А. И. и Журавлев А. И. 1961. Радиобиология, 1, 1 : 150—151.
- Топорец А. С. 1955. Монохроматоры. М.
- Фиш А. М., Саланский Н. И. и Чумакова Р. И. 1965. В сб.: Биоломинесценция, М. : 177—180.
- Флейшман Д. Г. 1962. Приборы и техника эксперимента, 5 : 98—102.
- Флейшман Д. Г. и Шахиджанян Л. Г. 1959. Приборы и техника эксперимента, 1 : 135—136.
- Хлебников Н. С., Меламид А. Е. и Ковалева Т. А. 1962. Радиотехника и электроника, 3 : 516—521.
- Хлебников Н. С., Меламид А. Е. и Тимошенков Ю. А. 1961. Приборы и техника эксперимента, 3 : 129—131.
- Чечик Н. О., Файнштейн С. М. и Лифшиц Г. М. 1957. Электронные умножители. М.
- Широков В. И. 1956. Изв. АН СССР, Сер. физ., 20, 3 : 603—607.
- Шишловский А. А. 1961. Прикладная физическая оптика. М.
- Яноши Л. 1955. Журн. эксперим. и теорет. физ., 28, 6 : 679—694.
- Якушин В. В. и Тельнов Ю. Я. 1963. Приборы и техника эксперимента, 4 : 120—122.
- Baldwin G. C. and Friedman S. I. 1965. Rev. Scient. Instrum., 36, 1 : 16—18.
- Bay Z. and Papp G. 1964. Trans IEEE PGNS, 11, 3 : 160—167.
- Birks J. B. 1964. The theory and practice of scintillation counting. Oxford—London—N. Y.
- Carter G., MacRae R. A., Nelson D. R., Burkhoff R. D. and Arakawa E. T. 1964. Appl. Optics, 3, 1 : 75—78.
- Chance B. 1940. Electronics, 13, 2 : 24—25.
- Eberhardt E. H. 1964. Trans. IEEE PGNS, 11, 3 : 48—55.
- Eisenberg L., Rosen P. and Edelman G. M. 1962. Rev. Scient. Instrum., 33, 12 : 1435—1440.
- Francin A. R., Holloway W. W. and McMahon D. H. 1965. Rev. Scient. Instrum., 36, 2 : 232.
- Gandy H. W. and Weller J. F. 1964. Rev. Scient. Instrum., 35, 3 : 413—414.
- Groves J. R. V. 1965. J. Scient. Instrum., 42, 6 : 430—431.
- Hartmann W. and Bernhard F. 1957. Fotovervieltacher und ihre Anwendung in der Kernphysik. (Перевод: Гартман В. и Бернгард Ф. 1961. Фотоэлектронные умножители. М.—Л.).
- Hayman L. G., Schwarzer R. M. and Schluter R. A. 1964. Rev. Scient. Instrum., 35, 3 : 393—406.
- Matheson R. M. 1964. Trans. IEEE PGNS, 11, 3 : 64—71.
- McLaren A. D. and Shugar D. 1964. Photochemistry of proteins and nucleic acids. Oxford—London—N. Y.—Paris.
- Naray Zs. 1956. J. Scient. Instrum., 33, 12 : 476—478.
- Stanley V. A. 1964. Trans. IEEE PGNS, 11, 3 : 114—119.
- Udenfriend S. 1962. Fluorescence assay in biology and medicine. N. Y. —London.
- Van Es W. L. and Wisse J. H. 1963. Analyt. Biochem., 6, 2 : 135—143.
- Walton R. W. 1964. Rev. Scient. Instrum., 35, 4 : 518—519.

К главе 6

- Авакян Ц. М., Аджян Н. С. и Апалян Р. Р. 1963. Биофизика, 8, 3 : 385—386.
- Авакян Ц. М., Тарусов Б. Н. и Адгоян С. Н. 1965. В сб.: Биоломинесценция, М. : 60—63.
- Агавердиев А. Ш. и Тарусов Б. Н. 1965. Биофизика, 10, 2 : 351—352.

- Аглинцев К. К. 1957. Дозиметрия ионизирующих излучений. М.
- Агроскин Л. С. и Королев Н. В. 1961. Биофизика, 6, 4 : 478—485.
- Агроскин Л. С., Предтеченский Ю. Б., Барский И. Я. и Шудель М. С. 1964. В сб.: Электронная и флуоресцентная микроскопия клеток, М.—Л. : 152—155.
- Артемов В. В. и Рожинова И. П. 1963. Изв. Крымск. астрофиз. обсерв., 30 : 297—307.
- Баренбойм Г. М. 1963. Взаимодействие кислорода с молекулами ароматических аминокислот, белков и нуклеиновых кислот в возбужденном синглетном состоянии. Автореф. дисс., Л.
- Баренбойм Г. М., Барский И. Я., Брумберг Е. М. и Пинто Р. И. 1962. Биофизика, 7, 3 : 351—356.
- Баренбойм Г. М., Доманский А. Н. и Правдина К. И. 1963. В сб.: XV Совещ. по спектроскопии, Тез. докл., Минск : 14.
- Баренбойм Г. М., Доманский А. Н. и Розанов Ю. М. 1964. В сб.: XIII Совещ. по люминесценции, Тез. докл., М. : 8.
- Баренбойм Г. М., Доманский А. Н. и Соломатин В. Ф. 1966. Приборы и техника эксперимента, 2 : 131—133.
- Баренбойм Г. М., Доманский А. Н., Розанов Ю. М. и Туроверов К. К. 1966. В сб.: Промышленность химических реактивов. Серия технической и экономической информации, М., № 8 (14).
- Баренбойм Г. М., Пинто Р. И. и Правдина К. И. 1963. Радиобиология, 3, 1 : 8—12.
- Бобрович В. П., Черницкий Е. А. и Конев С. В. 1965. Приборы и техника эксперимента, 2 : 187—188.
- Борисов А. Ю. 1960. Оптика и спектроскопия, 9, 1 : 115—116.
- Борисов А. Ю. и Мохова Е. Н. 1964. Приборы и техника эксперимента, 2 : 145—147.
- Брумберг Е. М. 1955. Журн. общ. биол., 16, 3 : 222—237.
- Брумберг Е. М. и Барский И. Я. 1961. Журн. общ. биол., 22, 6 : 459—466.
- Бурштейн Э. А. 1961. Биофизика, 6, 6 : 753—763.
- Бурштейн Э. А. и Владимиров Ю. А. 1964. Биофизика, 10, 1 : 48—55.
- Васильев Р. Ф. 1965. В сб.: Биолюминесценция, М. : 170—176.
- Васильев Р. Ф., Жучкова Т. Н. и Петухов С. М. 1963. Оптико-механическая промышленность, 3 : 2—3.
- Васильев Р. Ф., Карпухин О. Н. и Шляпихин В. Я. 1959. ДАН СССР, 125, 1 : 106—109.
- Владимиров Ю. А. и Бурштейн Э. А. 1960. Биофизика, 5, 4 : 385—392.
- Владимиров Ю. А. и Литвин Ф. Ф. 1959. Биофизика, 4, 5 : 601—606.
- Владимиров Ю. А. и Литвин Ф. Ф. 1964. Фотобиология и спектральные методы исследования. Практикум по общей биофизике. М., 8.
- Доманский А. Н., Плущенничаков А., Розанов Ю. М. и Туроверов К. К. 1966. В сб.: Материалы I научной конференции молодых специалистов Института цитологии АН СССР, Л. : 16.
- Каминский М. Г. 1959. Оптика и спектроскопия, 6, 1 : 103—106.
- Катибников М. А. и Конев С. В. 1961. Приборы и техника эксперимента, 4 : 166—169.
- Кисляк Г. М. 1958. Изв. Крымск. пед. инст., 29 : 358—369.
- Ковалева Т. А., Меламид А. Е., Писаревский А. Н., Резников И. В. и Шушкевич С. С. 1965. Приборы и техника эксперимента, 2 : 150—154.
- Лущик Ч. Б. 1955. Исследование центров захвата в щелочно-галоидных кристаллофосфорах. Тарту.

- Максимовский Л. Ф. 1964. Цитология, 6, 2 : 255—256.
- Матвеев В. В. и Соколов А. Д. 1962. Фотоумножители в сцинтилляционных счетчиках. М.
- Мекшенков М. И. и Андрейцев А. П. 1960. Биофизика, 5, 5 : 616—620.
- Мекшенков М. И. и Андрейцев А. П. 1961. Биофизика, 6, 5 : 615—619.
- Морозов Ю. В. и Тумерман Л. А. 1965. В сб.: Управляемый биосинтез и биофизика популяций, Тез. докл., Красноярск : 156.
- Перельман С. М., Малинин В. П. и Гийотте Н. М. 1959. Приборы и техника эксперимента, 6 : 95—97.
- Пилипович В. А. и Свешников Б. Я. 1958. Оптика и спектроскопия, 4, 1 : 166—120.
- Самылов С. В., Цукерман В. А. и Модель И. Ш. 1958. Журн. эксперим. и теорет. физ., 34, 3 : 599—607.
- Сапегинский И. Н. и Эмануэль Н. М. 1960. ДАН СССР, 131, 5 : 1168—1170.
- Тарусов Б. Н., Поливода А. И., Журавлев А. И. и Секамова Е. Н. 1962. Цитология, 4, 6 : 696—699.
- Троицкий Н. А., Конев С. В. и Катибников М. А. 1961. Биофизика, 6, 2 : 238—240.
- Фиш А. М., Саланский Н. И. и Чумакова Р. И. 1965. В сб.: Биолуминесценция, М. : 177—180.
- Хабахнашев А. Г. и Целуйкин В. А. 1964. Приборы и техника эксперимента, 1 : 202—203.
- Чечик Н. О., Файнштейн С. М. и Лифшиц Г. М. 1957. Электронные умножители. М.
- Шелков Л. С., Прагер Н. А. и Костин А. Г. 1959. Приборы и техника эксперимента, 30 : 50—52.
- Ягунов А. С. и Прокофьев А. Я. 1966. Цитология, 8, 4 : 569—572.
- Ainsworth S. and Winter E. 1964. Appl. Optics, 3, 3 : 371—383.
- Augenstein L. G., Carter J. G., Nelson D. R. and Joskey H. P. 1960. Radiation Res., Suppl., 2 : 19.
- Baum W. A. 1955. Astronom. J., 60, 1 (1224) : 25—28.
- Bowman R. L., Caufield P. A. and Udenfriend S. 1955. Science, 122, 2157 : 32—33.
- Colli L., Facchini U. e Rossi A. 1954. Nuovo cimento, 11, 3 : 255—261.
- Cormier M. J. 1960. Biochem. Biophys. Acta, 42, 2 : 333—337.
- Cowgill R. W. 1963. Arch. Biochim. Biophys., 100, 1 : 36—45.
- Eisenberg L., Rosen P. and Edelman G. M. 1962. Rev. Scient. Instrum., 33, 12 : 1435—1440.
- Fontijn A., Meyer C. B. and Shiff H. I. 1964. J. Chem. Phys., 40, 1 : 64—70.
- Gemiel C. L. 1956. Analyt. Chem., 28, 6 : 1061—1064.
- Haugen G. R. and Marcus R. J. 1964. Appl. Optics, 3, 9 : 1049—1056.
- Melhuish W. H. and Murashige R. H. 1962. Rev. Scient. Instrum., 33, 11 : 1213—1215.
- Parker C. A. 1958. Nature 182, 4641 : 1002—1004.
- Parker C. A. 1964. In: Advances in photochemistry, N. Y.—London—Sydney, 1 : 306—383.
- Parker C. A. and Rees W. T. 1960. Analyst, 85, 1013 : 587—600.
- Rosen P. and Edelman G. M. 1965. Rev. Scient. Instrum., 36, 6 : 809—815.
- Sommermeier K., Birkwald V. B. und Prütz W. 1961. Strahlentherapie, 116, 3 : 354—363.
- Springer H., Rowley G. R. and Jameson D. 1957. Science, 125, 3254 : 442—443.
- Teale F. W. J. and Weber G. 1957. Biochem. J., 65, 3 : 476—482.

- Udenfriend S. 1962. Fluorescence assay in biology and medicine. N. Y.—London.
 Udenfriend S. and Zaltzman P. 1962. Ann. Biochem., 3, 1: 49—59.
 Weber G. 1960. Biochem. J., 75, 2: 335—352.
 Weber G. 1961. In: Light and life, Baltimore: 82—107.

Дополнительная литература

- Васильев Р. Ф. 1966. Успехи физ. наук., 89, 3: 409—436.
 Владимиров Ю. А. 1965. Фотохимия и люминесценция белков. М.
 Владимиров Ю. А. 1966. Сверхслабые свечения при биохимических реакциях. М.
 Коцев С. В. 1965. Электронно-возбужденные состояния биополимеров. Минск.
 Соболева Н. А., Берковский А. Г., Чечик Н. О. и Елисеев Р. Е. 1965. Фотоэлектронные приборы. М.
 Шляпникох В. Я. (ред.) 1966. Свободнорадикальные процессы в биологических системах. М.
 Шляпникох В. Я., Карпухин О. Н., Постников Л. М., Захаров И. В., Вичутинский А. А. и Цепалов В. Ф. 1966. Хемилюминесцентные методы исследования медленных химических процессов. М.
 Seliger H. H. and McElroy W. D. 1965. Light: Physical and biological action. N. Y.—London.
 (Udenfriend S. 1962.) Юденфренд С. 1965. Флуоресцентный анализ в биологии и медицине. М.
 Wyman G. (ed.) 1966. Symposium on chemiluminescence. Photochem. a. Photobiol., 4, 6.

ОГЛАВЛЕНИЕ

	Стр.
От редактора	3
Предисловие	5
В в е д е н и е. Основные закономерности люминесценции растворов многоатомных органических молекул	7
0. 1. Электронно-колебательные спектры молекул и основные понятия люминесценции	7
0. 2. Оптические переходы между синглетными и триплетными уровнями	14
0. 3. Особенности люминесценции гетероатомных молекул	17
0. 4. Перенос электронной энергии возбуждения. Сенсибили- зированная люминесценция	20
0. 5. Тушение люминесценции	22
Г л а в а 1. Фотолюминесценция ароматических аминокислот, син- тетических полипептидов, белков и клеток	25
1. 1. Люминесценция аминокислот	28
1. 2. Общая характеристика люминесценции белков	34
1. 3. Флуоресценция и структура белков	37
1. 4. Исследование флуоресценции как метод изучения струк- туры и конформационных переходов белков	50
1. 5. Поляризация флуоресценции ароматических аминокислот и белков	60
1. 6. Ультрафиолетовая флуоресценция клеток	65
Г л а в а 2. Люминесценция пуринов, пиримидинов и нуклеиновых кислот	75
2. 1. Люминесценция пуринов и пиримидинов	77
2. 2. Люминесценция нуклеиновых кислот	87
Г л а в а 3. Радиолюминесценция биополимеров и их составляю- щих	97
3. 1. Первичные и вторичные процессы возбуждения	97

3. 2. Радиolumинесценция и ее основные характеристики . . .	101
3. 3. Выход радиolumинесценции	107
3. 4. Радиolumинесценция и роль возбужденных состояний в радиобиологии	110
Глава 4. Хемилюминесценция клеток и организмов	116
4. 1. Темновая хемилюминесценция	117
4. 2. Функциональная хемилюминесценция (биolumинесценция)	129
4. 3. Наведенная хемилюминесценция	139
Глава 5. Особенности элементов аппаратуры для регистрации люминесценции биологических объектов	147
5. 1. Выбор элементов аппаратуры	147
5. 2. Методы снижения шумов ФЭУ	157
5. 3. Сравнение методов регистрации сигналов с ФЭУ	166
5. 4. Некоторые особенности применения метода счета им- пульсов	171
Глава 6. Установки для изучения люминесценции биополимеров и клеток	178
6. 1. Общие характеристики установок для регистрации фото- люминесценции	178
6. 2. Фотоэлектрическая универсальная установка	182
6. 3. Простой спектрофлуориметр	189
6. 4. Установка для измерения интенсивности флуоресценции микроструктур биологических объектов	192
6. 5. Установка для регистрации радиolumинесценции . . .	195
6. 6. Установка для регистрации сверхслабых свечений . .	199
Заключение	203
Литература	207

Григорий Матвеевич Баренбойм,
Александр Николаевич Доманский,
Константин Константинович Туроверов

ЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ БИОПОЛИМЕРОВ И КЛЕТОК

*Утверждено к печати
Институтом цитологии
Академии наук СССР*

Редактор издательства *Е. Е. Мазлин*
Художник *Я. В. Таубеурцель*
Технический редактор *Н. Ф. Виноградова*
Корректоры *Н. В. Лихарева, Г. А. Ми-*
рошниценко и Т. Г. Эдельман

Сдано в набор 30/V 1966 г. Подписано
к печати 27/IX 1966 г. РИСО АН СССР
№ 42-85В. Формат бумаги $60 \times 90^{1/16}$. Бум.
л. $7^{5/8}$. Печ. л. $14^{3/4} + 4$ вкл. ($1/2$ печ. л.) $\equiv$
 $\equiv 15.25$ усл. печ. л. Уч.-изд. л. 15.91. Изд.
№ 2882. Тип. зак. № 995. М-27822.
Тираж 4300. Бумага типографская № 2.

Цена 1 р. 08 к.

Ленинградское отделение издательства
«Наука»

Ленинград, В-164, Менделеевская лин., д. 1

1-я тип. издательства «Наука». Ленинград,
В-34, 9 линия, д. 12

ИЗДАТЕЛЬСТВО «НАУКА»

ИМЕЮТСЯ В ПРОДАЖЕ КНИГИ

Исследования по люминесценции. Труды Физического института. Том 23. 1963. 168 стр. Цена 98 к.

Люминесценция. Библиографический указатель. 1947—1961 гг.

Том 2. 1965. Цена 2 р.

ИСПРАВЛЕНИЕ И ОПЕЧАТКА

Страница	Строка	Напечатано		Должно быть	
150	Рис. 5.2, название первой и второй слова радиоламп	6Н5С	6Н5С	6Н2П	6Н2П
155	Табл. 5.3, грифы 3 и 4 слова, 1 снизу	255±25	230—280	200—400	255±25

Люминесценция

Основы радиационной биологии. 1964. 404 стр. Цена 2 р. 30 к.

Морфология и физиология простейших. 1963. 155 стр. Цена 1 р. 17 к.