

АКТИВИРОВАННАЯ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ И БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ КАК ИНСТРУМЕНТ В МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

Ю. А. ВЛАДИМИРОВ

Российский государственный медицинский университет, Москва

ENHANCED CHEMILUMINESCENCE AND BIOLUMINESCENCE AS AN ANALYTICAL TOOL IN BIOMEDICAL INVESTIGATIONS

Yu. A. VLADIMIROV

Free-radical reactions accompanied by a weak luminescence are considered. They can be increased thousands times with substances, named enhancers. Brilliant bioluminescence can be emitted by certain organisms. Both enhanced chemiluminescence and bioluminescence are used in experiments and clinical investigations.

Рассмотрены реакции свободных радикалов, сопровождающиеся слабым свечением – хемилюминесценцией, которая может быть усилена в тысячи раз в присутствии активаторов. Яркое свечение, называемое биолюминесценцией, характерно для некоторых организмов. Измерения хемилюминесценции и биолюминесценции используются в эксперименте и клинике.

www.issep.rssi.ru

ВВЕДЕНИЕ

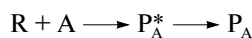
Хемилюминесценцией (ХЛ) называется свечение, сопровождающее некоторые биохимические реакции. Клетки и ткани животных обычно излучают свет в процессе своей жизнедеятельности, но такой слабый, что его долгое время не удавалось обнаружить (излучение назвали сверхслабым свечением [1]). Это собственное свечение клеток и тканей обусловлено в основном реакциями с участием свободных радикалов, и его измерение используется в научных исследованиях и в целях лабораторного клинического анализа в тех случаях, когда важно обнаружить и изучить появление свободных радикалов в живых системах. Низкая интенсивность свечения служит, однако, серьезным препятствием для подобных исследований.

ЧТО ТАКОЕ АКТИВАЦИЯ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ

Низкая интенсивность собственной хемилюминесценции [1, 2] оказалась главным и пока непреодоленным препятствием на пути к ее широкому использованию в аналитических целях. Значительное распространение получило, однако, измерение хемилюминесценции в присутствии определенных соединений, которые в отечественной литературе называют активаторами, а за рубежом – усилителями (enhancer) хемилюминесценции. По механизму действия активаторы распадаются на две четко различающиеся группы – химические и физические [3].

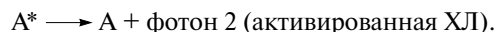
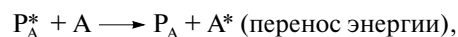
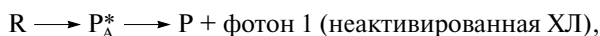
Химические активаторы хемилюминесценции – это соединения, вступающие в химические реакции с активными формами кислорода или органическими свободными радикалами, в ходе которых образуются молекулы продуктов в возбужденном электронном состоянии. Наблюдаемое при этом свечение связано с

переходом молекул в основное состояние, что приводит к высвечиванию фотонов:



Здесь R – радикал, A – химический активатор, P – ответственный за хемилюминесценцию продукт превращения молекулы активатора в возбужденном (P_A^*) и основном (P_A) электронных состояниях. Хорошо известными представителями таких активаторов могут служить люминол (3-аминофталевоый гидразид, см. рис. 1) и люцигенин – бис(N-метилакридиний). На рис. 1 дана упрощенная схема превращений люминола в присутствии радикалов кислорода [4]. Под действием окислителя (в данном случае радикала гидроксила) происходит образование радикала люминола, который затем вступает в реакцию с супероксидным радикалом, образуя внутреннюю перекись (диоксид). Ее разложение приводит к образованию возбужденной молекулы 3-аминофталаата. Переход этой молекулы в основное состояние сопровождается испусканием кванта света.

Физические активаторы не вступают в химические реакции и не влияют на ход реакций, сопровождающихся свечением, но тем не менее многократно усиливают интенсивность хемилюминесценции. В основе их действия лежит физический процесс переноса (миграции) энергии с молекулы продукта хемилюминесцентной реакции на активатор¹:



Интенсивность свечения при реакциях хемилюминесценции ($I_{\text{хл}}$) зависит от трех параметров: скорости химической реакции, которая сопровождается свечением ($\nu_{\text{хл}}$), вероятности образования молекулы продукта в электронно-возбужденном состоянии (квантовым выходом возбуждения, η_{exc}) и вероятности высвечивания фотона при переходе возбужденной молекулы продукта в основное состояние (квантовый выход люминесценции, η_{lum}) [4]:

$$I_{\text{хл}} = \nu_{\text{хл}} \times \eta_{\text{exc}} \times \eta_{\text{lum}}$$

Химические активаторы свечения по существу направляют реакции свободных радикалов в новое русло, поскольку реагируют с радикалами с образованием возбужденных молекул продуктов этой реакции. Свечение при этом имеет высокую интенсивность, поскольку все три сомножителя в уравнении в этих реакциях довольно велики. Физические активаторы хемилюминесценции (в англоязычной литературе называемые сенситизаторами – sensitizers) не влияют на ход химических реакций и увеличивают интенсивность люминесценции за счет физического процесса переноса энергии на молекулу активатора, которая обладает высоким квантовым выходом люминесценции. Иными словами, они увеличивают только величину квантового выхода испускания

¹ Перенос энергии электронного возбуждения (миграция энергии) – это процесс взаимодействия электронно-возбужденной молекулы с невозбужденной при небольших расстояниях между молекулами (несколько десятков ангстрем) и при условии равенства энергий возбужденного состояния молекулы – донора энергии и молекулы-акцептора. Последнее проявляется в перекрывании спектра люминесценции донора и спектра поглощения акцептора [4].

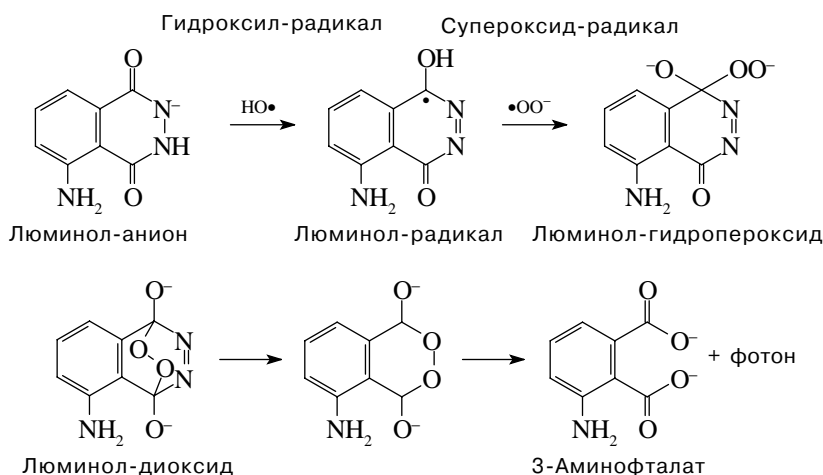
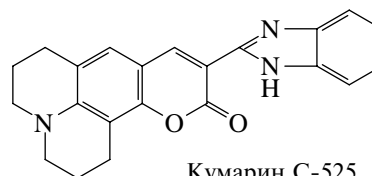


Рис. 1. Химические превращения люминола под действием активных форм кислорода – радикалов гидроксила и супероксида. Продукт реакций 3-аминофталаат образуется в электронно-возбужденном состоянии и переходит в основное состояние с испусканием кванта света

фотона возбужденной молекулой продукта (η_{lum}). В обычных реакциях свободных радикалов эта величина довольно мала, всего десятые или даже сотые доли процента, отчего и сама неактивированная хемилюминесценция имеет очень низкую интенсивность, и ее часто называют сверхслабым свечением. Но если все молекулы продукта передадут энергию электронного возбуждения на молекулы активатора, то интенсивность свечения будет определяться уже квантовым выходом люминесценции активатора, который в идеале приближается к единице. Интенсивность свечения увеличивается при этом на 3–4 порядка.

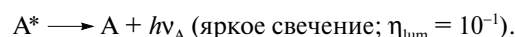
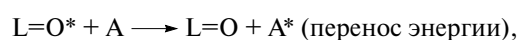
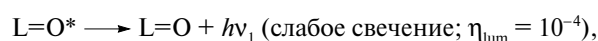
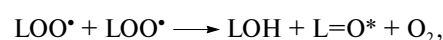
К физическим активаторам можно отнести некоторые люминесцирующие соединения, применяемые для усиления ХЛ при цепном окислении липидов. Дело в том, что, несмотря на полезность получаемой информации, измерение этой хемилюминесценции пока еще не стало рутинным лабораторным методом в значительной мере из-за ее низкой интенсивности. Поэтому ведется поиск веществ, усиливающих липидную ХЛ. Оказалось, что некоторые красители и комплексы редкоземельных элементов обладают способностью многократно усиливать интенсивность такой хемилюминесценции (табл. 1). Самым эффективным активатором оказалось производное кумарина, применяемое при создании лазеров под названием С-525, которое усили-

вало хемилюминесценцию, сопровождающую цепное окисление липидов, более чем в 1500 раз, никак не влияя при этом на ХЛ при взаимодействии радикалов кислорода (гидроксила и супероксида). Формула этого вещества приведена ниже.



Кумарин С-525

В случае цепного окисления липидов образуются возбужденные молекулы кетонов ($L=O^*$). В присутствии кумаринов происходит перенос энергии на это ярко люминесцирующее соединение и интенсивность хемилюминесценции резко возрастает:



ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АКТИВИРОВАННОЙ ХЛ В БИОХИМИЧЕСКИХ АНАЛИЗАХ

Обнаружение катализаторов, разлагающих пероксид водорода с образованием свободных радикалов. Пероксид водорода постоянно образуется в организме человека, хотя и в небольших количествах. Само по себе это относительно безобидное соединение, но в присутствии ионов металлов переменной валентности (железа, меди, марганца, хрома) или геминовых соединений из пероксида водорода (H_2O_2) образуется разрушительный гидроксильный радикал ($\cdot OH$), способный вызывать мутации, инактивировать ферменты и повреждать биологические мембраны. В присутствии люминола гидроксильный радикал вступает с ним в химическую реакцию, что приводит к яркому свечению, связанному с реакциями люминола (см. рис. 1). По этой причине хемилюминесценцию в присутствии люминола часто используют для определения в биологических средах малых количеств геминовых соединений, металлов переменной валентности, а также вообще способности биологического материала разлагать перекись водорода с образованием радикалов. Приведем некоторые примеры.

У больных инфарктом миокарда в моче могут появиться небольшие количества миоглобина. Гемсодержащие соединения, к которым относится миоглобин, дают яркое свечение в присутствии перекиси водорода и люминола в сильно щелочной среде. Свечение мочи

Таблица 1. Максимальное усиление хемилюминесценции при перекисном окислении липидов (липосомы в присутствии ионов Fe^{2+})*

Активатор	КУ	С, мкМ	λ_{max} , нм
9,10-Дибромантрацен	5	6	440
Eu ³⁺ -тетрацилин	1120	1	620
Tb ³⁺	10	100	545
Хлорофилл <i>a</i>	160	49	
Протопорфирин-IX	16	100	635
Бактериофеофорбид	360	2	680
Бактериофеофитин	80	3,3	680
Мезо-тетрафенилпорфирин	7	100	650
Родамин Ж	37	60	
Хинолизин-кумарины:			
С-525	1620	20	512
С-510	992	53	510
С-338	733	0,53	510
С-153	350	2,6	508
С-504	585	92	506

*КУ — коэффициент усиления: отношение амплитуды “медленной вспышки” хемилюминесценции в присутствии активатора к этой же величине при его отсутствии; С — концентрация, при которой наблюдали максимальное усиление ХЛ; λ_{max} — положение максимума в спектре люминесценции.

в этих условиях может служить одним из показателей инфаркта у больного (Барон, 1985, цит. по [1]).

На поверхности свежей раны выделяется жидкость, называемая раневым экссудатом. В ней содержится каталаза — фермент, разлагающий перекись водорода без образования свободных радикалов. Наряду с этим жидкость содержит другие гемсодержащие белки и ионы железа, которые катализируют разложение перекиси водорода с образованием свободных радикалов кислорода, токсичных для клеток окружающей ткани. При добавлении к раневому экссудату перекиси водорода с люминолом наблюдается хемилюминесценция, тем более сильная, чем больше радикалов образуется при разложении перекиси. Таким образом, хемилюминесценция показывает, сколько токсичных радикалов образуется в экссудате. В свежей ране таких радикалов много, а по мере заживления их становится все меньше и меньше. Ускорение заживления ран за счет применения лекарственных средств или облучения светом лазера сопровождается соответственным снижением хемилюминесценции экссудата. Таким образом, этот метод позволяет врачу контролировать эффективность лечения и вносить коррективы в сроки и дозы применения лечебных процедур [5].

Люминесценция фагоцитов. Некоторые клетки организма: гранулоциты и моноциты в крови и тканевые макрофаги — в целях борьбы с чужеродными клетками, такими, как болезнетворные бактерии и грибы, выделяют так называемые активные формы кислорода, к которым относятся супероксидный радикал ($\cdot O_2^-$), пероксид водорода (H_2O_2), радикал гидроксила ($\cdot OH$). При этом наблюдается очень слабая хемилюминесценция, которая усиливается в тысячи раз в присутствии люминола (или люцигенина) [2–4]. На рис. 2, а в качестве примера показана хемилюминесценция клеток крови при действии на кровь кратковременных электрических импульсов, вызывающих увеличение проницаемости клеточных мембран и стимуляцию выделения клетками активных форм кислорода. Такие же хемилюминесцентные ответы можно получить, если добавить к лейкоцитам крови суспензию бактерий, изолированные оболочки дрожжевых клеток, кристаллы кварца или сульфата бария, а также определенные химические соединения. Все эти агенты получили собирательное название стимулов. Стимулированная ХЛ клеток в присутствии люминола — ценный показатель функционального состояния фагоцитов крови и тканей, их способности производить при необходимости активные формы кислорода, то есть выполнять свою защитную функцию. Эта способность обычно усиливается при возникновении в организме очагов воспаления (например, после инфаркта миокарда) и в других случаях. Наоборот, при длительном недостатке кисло-

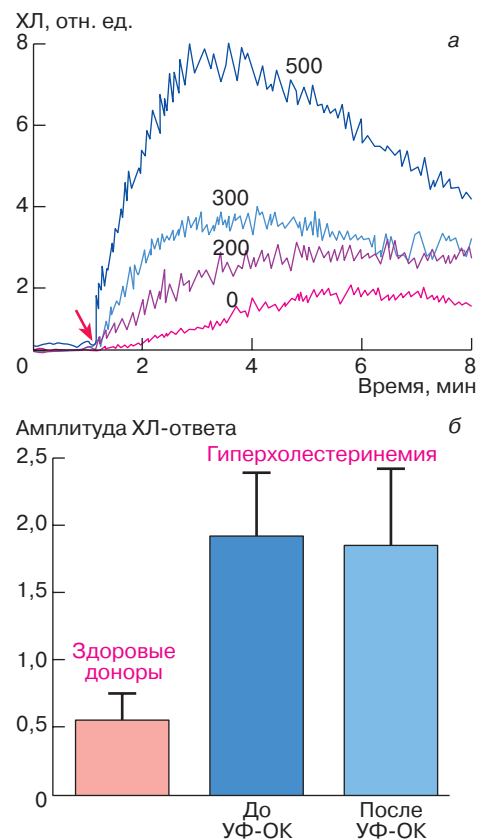


Рис. 2. Хемилюминесценция клеток крови после их стимуляции электрическими импульсами: а — кривые хемилюминесценции в присутствии люминола после действия на кровь электрических импульсов разного напряжения (значения амплитуды импульсов в вольтах даны около кривых); б — различия в ХЛ-ответах клеток здоровых доноров и больных семейной гиперхолестеринемией. Назначенное лечение — УФ-облучение крови (УФ-ОК) оказалось неэффективным, если верить данному показателю. Результаты получены в клинике Гумбольдта, Берлин

рода, связанном с общим ослаблением организма, активность фагоцитов и ХЛ-ответы снижаются. Два результата таких исследований даны в качестве примера на рис. 2, б и 3.

Как видно на рис. 2, б, у больных семейной гиперхолестеринемией (при этой наследственной болезни в крови содержится много холестерина и имеется выраженная предрасположенность к раннему развитию атеросклероза) ХЛ-ответ клеток на стимул почти в четыре раза превышает ответ клеток здоровых доноров. Назначенное лечение — облучение крови ультрафиолетовым светом (УФ-ОК) оказалось малоэффективным, если верить данному показателю.

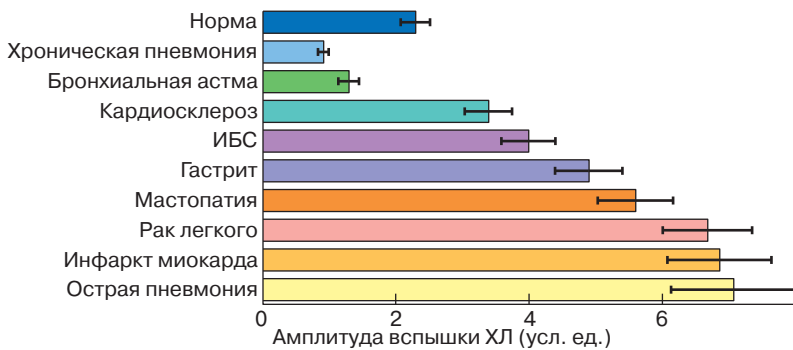


Рис. 3. Амплитуда ХЛ-ответов изолированных лейкоцитов крови, полученной от больных различными заболеваниями. Стимулирование клеток осуществляли частичками латекса

В Институте физико-химической медицины М.П. Шерстнев [3] провел обследование большой группы больных различными заболеваниями (см. рис. 3). При затяжных хронических заболеваниях свечение клеток снижалось, тогда как при возникновении или обострении воспалительного процесса у больных происходило резкое увеличение активности клеток-фагоцитов. Так организм встречает инфекционную опасность — усиливается способность фагоцитов выделять активные формы кислорода для борьбы с чужеродными микроорганизмами.

Хотя люминесценция люминола — весьма чувствительный метод обнаружения радикалов кислорода, метод не очень специфичен. Свечение наблюдается при действии на люминол не только радикалов гидроксила, но и при действии гипохлорита и других окислителей. Заметный вклад в ХЛ-ответ клеток вносит выделение окиси азота: ингибитор NO-синтазы (фермента, катализирующего образование окиси азота в клетках) уменьшает интенсивность свечения нейтрофилов почти вдвое.

Большой избирательностью отличается люцигенин, свечение которого происходит при восстановлении красителя супероксидными радикалами. Это соединение часто используют для изучения образования супероксидных радикалов различными клетками и биохимических реакциях в пробирке.

Хемилюминесцентный иммунный анализ. По идеологии хемилюминесцентный иммунный анализ не отличается от радиоиммунного, с той только разницей, что вместо радиоактивно-меченых субстратов или антител используют субстраты и антитела, меченные соединением, которое вступает в реакции, сопровождающиеся хемилюминесценцией, в присутствии перекиси водорода и катализатора (обычно это фермент пероксидаза). Хемилюминесцентными метками (ХЛ-метками) чаще всего служат низкомолекулярные соединения, по химической структуре близкие люминолу и люцигенину, такие, как изолюминол, сукцинированный люминол, эфиры акридиния и др. Присоединение хеми-

люминесцентной метки производится либо к антигену, то есть низкомолекулярному соединению, либо к антителу на этот антиген. В первом случае метод называется CIA (Chemiluminescent Immuno Assay), во втором — ICMA (ImmunoChemiluminoMetric Assay). По-русски это соответствовало бы ХИА (хемилюминесцентный иммунный анализ) и ИХМА (иммуно-хемилюминесцентный анализ). Оба метода направлены на определение биологически важных низкомолекулярных соединений (например, гормонов) в тех концентрациях (как правило, очень низких), в которых они встречаются в биологических объектах.

При использовании метода CIA (рис. 4, А) к раствору, содержащему интересующее нас анализируемое соединение (обозначим его как А), добавляют определенное количество того же, но ХЛ-меченого соединения (обозначим его как А*) и антитела (анти-А). Образуется смесь меченых и немеченых иммунных комплексов (А-анти-А и А*-анти-А соответственно):

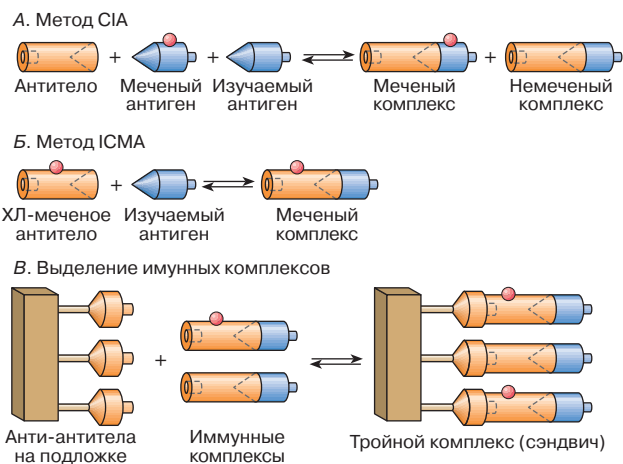
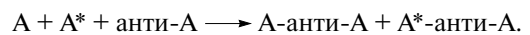


Рис. 4. Принцип иммунохемилюминесцентного анализа. Объяснения в тексте

Очень важно, что пропорция между меченым и немеченым иммунными комплексами зависит от того, сколько меченого антигена было добавлено (A^*) и сколько немеченого находилось в исследуемой пробе (A), а именно чем больше было немеченого антигена, тем меньше доля меченых антител. Теперь остается очистить смесь иммунных комплексов и определить количество A^* -анти- A по хемилюминесценции. Интенсивность ХЛ будет тем меньше, чем больше было немеченых антигена A (то есть анализируемого вещества) в исследуемой пробе. Чтобы анализ был количественным, предварительно строят калибровочную кривую, то есть измеряют зависимость интенсивности ХЛ в конечной пробе от концентрации стандартного раствора изучаемого вещества A . Затем измеряют интенсивность ХЛ в растворе с неизвестной концентрацией антигена (A), повторяя те же процедуры, и по калибровочной кривой находят концентрацию A .

При использовании метода ИСМА (рис. 4, *Б*) берут избыток ХЛ-меченого антигена (анти- A^*) и добавляют к нему раствор с изучаемым веществом (A). Образуется ХЛ-меченый иммунный комплекс:



Остается отделить иммунные комплексы от других участников реакции и измерить интенсивность ХЛ. В данном случае она будет тем выше, чем больше было анализируемого вещества A в пробе. Для количественного анализа и здесь предварительно строят калибровочную кривую.

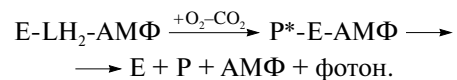
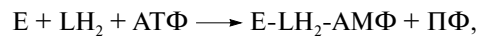
В обоих методах одна из практических трудностей — это очистка иммунных комплексов. Она решается также методами иммунохимии. Детали этой техники мы рассматривать не будем, но один из подходов заключается, например, в использовании порошка сорбента (см. рис. 4, *В*), к поверхности которого пришиты (то есть присоединены ковалентной химической связью) антитела к анти- A (назовем их анти-анти- A). В присутствии растворенных комплексов (A -анти- A и/или A^* -анти- A) образуется тройной комплекс (сэндвич): (анти-анти- A)-(анти- A)- A и/или (анти-анти- A)-(анти- A)- A^* . Адсорбент можно осадить и затем определить в осадке (после дополнительных обработок) количество меченого антигена.

БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ

Биолюминесценция (БЛ) — это свечение живых организмов, видимое простым глазом. Способностью к БЛ обладают организмы, принадлежащие к самым разным систематическим группам: бактериям, грибам, моллюскам, насекомым. Механизм реакций, сопровождающихся свечением, различен у разных видов, однако обычно включает в себя химическое превращение оп-

ределенного низкомолекулярного субстрата, называемого люциферин, катализируемое ферментом люциферазой.

Биолюминесценция светляка. Всем известное свечение светляков происходит в результате биохимической реакции окисления светлякового люциферина кислородом воздуха в присутствии аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ):



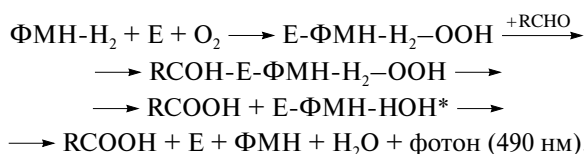
Здесь АМФ — аденозинмонофосфат, ПФ — пирофосфат, E — люцифераза, LH_2 — люциферин, P^* и P — продукт реакции (оксилюциферин) в возбужденном и основном состояниях соответственно.

При отсутствии АТФ биолюминесценции не наблюдается, на этом основан один из самых чувствительных методов анализа АТФ в различных объектах. Для определения содержания АТФ измеряют хемилюминесценцию в изучаемом растворе, к которому добавляют смесь люциферина и люциферазы. Удастся определить содержание АТФ в образце от 10^{-17} моля и выше.

Поскольку биосинтез АТФ — показатель нормальной жизнедеятельности клеток, препарат люциферин — люцифераза светляка используют для обнаружения бактериального заражения в какой-либо среде, для оценки жизнеспособности эритроцитов при консервировании крови, изучения действия на микроорганизмы антибиотиков и т.д. В последнее время используют препараты иммобилизованной люциферазы (фермента, молекулы которого химически связаны с полимерной пленкой), стабильность которой выше, такой препарат можно использовать многократно.

Биолюминесценция медузы *Aequorea*. В последнее время для обнаружения малых количеств ионов кальция широко используется хемилюминесценция белка, выделенного из медузы *Aequorea*. Этот фотопротейн, называемый экворин, содержит в себе ковалентно связанный люциферин, который в присутствии ионов Ca^{2+} подвергается химическим превращениям с образованием продукта в возбужденном электронном состоянии. Вследствие малой инерционности и высокой чувствительности биолюминесцентный метод весьма эффективен при изучении высвобождения и связывания Ca^{2+} в биологических системах, например во время мышечного сокращения. При этом экворин добавляют прямо к изучаемому объекту и по интенсивности биолюминесценции следят за динамикой изменения содержания свободного кальция.

Биолюминесценция светящихся бактерий. К числу светящихся относится немного видов бактерий. Хемилюминесцентная реакция, непосредственно сопровождаемая свечением, катализируется ферментом – бактериальной люциферазой и включает в себя процессы окисления восстановленного флавиномононуклеотида ФМН-Н₂ до ФМН и одновременно алифатического (С₁₄) альдегида до миристиновой (С₁₄) кислоты. Эта реакция протекает, по-видимому, через стадию образования пероксида флавиномононуклеотида:



Здесь E – люцифераза, ООН – гидроперекисная группа, RCON – алифатический альдегид, RCOON – жирная кислота, образующаяся при окислении альдегида.

В последние годы получают все большее распространение биохимические анализы, в которых в качестве тест-объекта используют целые бактериальные клетки (в суспензии), экстракты светящихся бактерий, изолированный фермент – люциферазу. В таблице приведены некоторые примеры использования бактериальной биолюминесценции в биохимических анализах.

Прежде всего измерение биолюминесценции бактерий можно использовать для определения низких концентраций кислорода. Дело в том, что при отсутствии кислорода фотобактерии не обладают свечением, свечение усиливается пропорционально концентрации кислорода в среде в интервале концентраций O₂ от 2 × 10⁻⁸ до 5 · 10⁻⁶ моль/л.

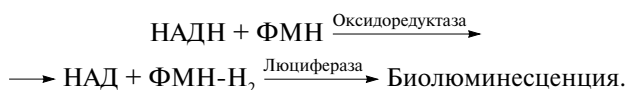
Можно использовать светящиеся бактерии и в качестве лабораторного животного, то есть живых организмов, на которых изучают действие различных токсических веществ. Светящиеся бактерии чувствительны к примесям токсических веществ в воде, и измерение биолюминесценции можно использовать для оценки загрязнения воды токсическими соединениями, например ионами тяжелых металлов. Кроме того, свечение бактерий можно использовать для предварительной оценки эффективности новых антибиотиков.

Но наиболее перспективно применение очищенных препаратов бактериальной люциферазы. Фермент, очищенный от примесей низкомолекулярных соединений, обладает способностью к излучению света лишь в присутствии всех трех субстратов: кислорода, ФМН-Н₂ и длинноцепочечного альдегида (с длиной цепи не менее восьми углеродных атомов). Добавив к изолированной бактериальной люциферазе ФМН-Н₂, исследователь получает высокочувствительную систему для определения алифатических альдегидов. К их числу

принадлежат, в частности, половые гормоны насекомых, феромоны, которые обнаруживаются в количестве 10⁻¹⁴ моля, что позволяет изучать метаболизм этих веществ у одной особи. В медицине найдет широкое применение анализ содержания ФМН и ФАД, основанный на биолюминесцентном определении ФМН-Н₂, образующегося при их предварительном восстановлении.

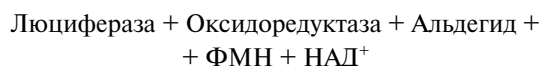
Наиболее широкое применение в биохимических и клинических лабораторных анализах обещает получить препарат, состоящий из смеси двух компонентов (ферментов): бактериальной люциферазы и НАДН: ФМН-оксидоредуктазы.

В отечественном наборе КРАБ (комплект реактивов для анализа биолюминесценции) содержатся люцифераза и оксидоредуктаза, выделенные из биомассы светящихся бактерий. Добавив к препарату в присутствии С₁₅-альдегида НАДН, можно получить высокочувствительный реактив для определения ФМН (без его предварительного восстановления):

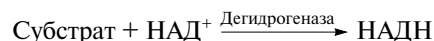


Наоборот, если добавить к смеси люциферазы и оксидоредуктазы альдегид и ФМН, то такая смесь может использоваться как биолюминесцентная тест-система для количественного определения НАДН в биологических материалах (схема реакций такая же).

Удлиняя цепочку биохимических стадий, предшествующих биолюминесценции, можно получить все новые аналитические возможности. Для определения активности ферментов дегидрогеназ или (альтернативно) концентрации субстратов этих ферментов используется следующая тест-система:



В присутствии субстрата какой-либо дегидрогеназы, например лактата, можно определять по биолюминесценции активность соответствующей дегидрогеназы (в нашем примере активность ЛДГ, лактатдегидрогеназы):



и далее по схеме, приведенной выше.

В присутствии изолированной дегидрогеназы можно определять концентрацию субстрата этого фермента в интересующей нас химической или биохимической системе (схема реакций та же).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время химические и физические явления, которые лежат в основе превращения энергии

биохимических реакций в световое излучение, в основном расшифрованы. Началось более или менее широкое использование хеми- и биолюминесценции в биохимических лабораторных и клинических исследованиях. Создаются серийные приборы — хемилюминометры и биолюминометры, выпускаются наборы реактивов для анализа определенных антигенов, антител и ферментов в крови больных и других биологических жидкостях. Ведется поиск новых соединений, обладающих способностью вступать в химические реакции, сопровождающиеся свечением, с химически активными продуктами жизнедеятельности живых клеток, такими, как свободные радикалы и пероксиды (химические активаторы ХЛ), равно как и веществ, усиливающих квантовый выход хемилюминесценции (физические активаторы ХЛ).

Одновременно с этим расширяется применение в аналитических целях методов биолюминесценции. Прогресс органической химии, молекулярной биологии и биотехнологии избавил нас от необходимости путешествовать на юг, чтобы ловить по ночам светлячков или охотиться в океане за медузами, чтобы выделить из живых существ фермент люциферазу и субстрат биолюминесцентных реакций — люциферин: люциферин научились синтезировать, а многие люциферазы можно получить сейчас методами генной инженерии.

Короче говоря, применение методов хеми- и биолюминесценции, безусловно, поможет пролить свет на многие загадки, еще не решенные учеными.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Владимиров Ю.А.* Сверхслабые свечения при биохимических реакциях. М.: Наука, 1966.
2. *Владимиров Ю.А.* Свечение, сопровождающее биохимические реакции // Соросовский Образовательный Журнал. 1999. № 6. С. 25–32.
3. *Владимиров Ю.А., Шерстнев М.П.* Хемилюминесценция клеток животных // Итоги науки и техники. Биофизика. 1989. Т. 24.
4. *Владимиров Ю.А., Потапенко А.Я.* Физико-химические основы фотобиологических процессов. М.: Высш. шк., 1989.
5. *Владимиров Ю.А.* Лазерная терапия: Настоящее и будущее // Соросовский Образовательный Журнал. 1999. № 12. С. 2–8.

Рецензент статьи А.Н. Тихонов

* * *

Юрий Андреевич Владимиров, профессор, зав. кафедрой биофизики Российского государственного медицинского университета и зав. кафедрой физико-химических основ медицины МГУ, академик АМН, руководитель отдела биофизики Института физико-химической медицины МЗ РФ, лауреат Государственной премии СССР. Автор 400 научных работ, включая 11 монографий и учебников.