

ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ ТКАНЕЙ РАСТЕНИЙ

Хемилюминесценцией (ХЛ) называется люминесценция, возбуждаемая в результате химической реакции. ХЛ имеет две стадии: химическую, в которой происходит электронное возбуждение продукта в единичном акте химической реакции и физическую, в которой возбужденный продукт испускает квант света при переходе из синглетного или триплетного состояния в основное.

Вероятность образования в результате химической реакции возбужденного продукта называется квантовым выходом возбуждения (K_v). Он равен отношению количества возбужденных молекул продукта к общему количеству молекул продукта, полученных в результате реакции. Вероятность испускания света возбужденными молекулами продукта называется квантовым выходом люминесценции (K_l) и является отношением количества квантов света, испущенных молекулами продукта, к количеству возбужденных молекул продукта. Величины квантовых выходов возбуждения и люминесценции всегда меньше единицы.

Интенсивность излучения света в ХЛ реакции ($I_{хл}$) пропорциональна скорости химической реакции (w) и величинам квантовых выходов возбуждения и люминесценции:

$$I_{хл} = w \cdot K_v \cdot K_l$$

На интенсивность ХЛ могут влиять тушители (Т), которые перехватывают энергию возбужденного продукта и переводят ее в тепловую форму. Интенсивность ХЛ в этом случае описывается уравнением Штерна-Фольмера:

$$I_T = \frac{I_0}{1 + k \cdot \tau \cdot [T]}$$

где I_0 - интенсивность ХЛ в отсутствии тушителя, I_T - интенсивность ХЛ в присутствии тушителя, τ - время жизни возбужденного состояния продукта ХЛ реакции $[T]$ - концентрация тушителя, k - константа взаимодействия

Добавление в ХЛ систему соединений, обладающих высоким квантовым выходом люминесценции - активаторов, может привести к усилению излучения в связи с тем, что энергия возбуждения продукта будет передаваться на молекулу активатора:



P^* и P - молекулы продукта в возбужденном и основном состояниях A^* и A - молекулы активатора в возбужденном и основном состояниях.

Спектральный состав излучения соответствует спектру люминесценции продукта или активатора. Спектр излучения активатора всегда располагается в более длинноволновой области, чем спектр люминесценции продукта. Известны ХЛ реакции, в которых излучение кванта света происходит как с синглетного возбужденного уровня (флуоресценция), так и с триплетного возбужденного уровня (фосфоресценция). Коротковолновая граница светового излучения при ХЛ должна удовлетворять следующему условию:

$$h\nu \leq E_a + \Delta H,$$

где $h\nu$ - произведение постоянной Планка ($6,6 \cdot 10^{-27}$ эрг·с или $1,6 \cdot 10^{-37}$ Ккал·с) на частоту колебаний электромагнитного излучения (для видимого света от $4,4$ до $7,3 \cdot 10^{14}$ Гц), E_a - энергия активации химической реакции, ΔH - изменение энтальпии в ходе реакции (Рис.1).

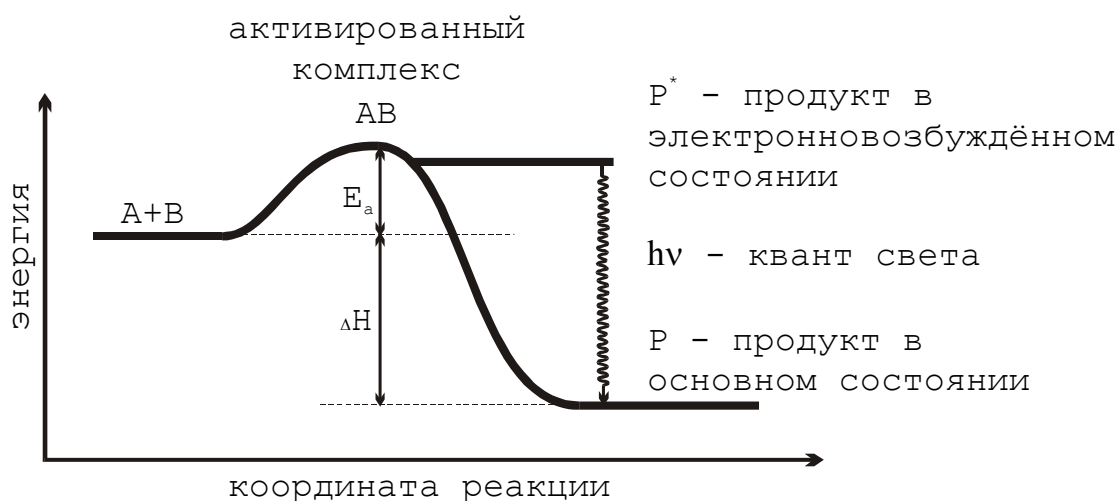


Рис.1 Энергетика процесса хемилюминесценции для реакции $A + B \rightarrow AB \rightarrow P + h\nu$

Для генерации кванта света в видимой области спектра в элементарном химическом акте должна выделиться порция энергии от 1,8 до 3,1 электронвольт или 41-71 Ккал/моль (171-298 кДж/моль), что близко по величине к энергии ковалентной связи. (Энергия, выделяемая при гидролизе молекулы АТФ около 7 Ккал/моль.) К наиболее экзотермичным реакциям относят рекомбинацию свободных радикалов, рекомбинацию ионных пар и некоторые виды переноса электрона от анион-радикалов на окислитель. При соответствующих условиях все три типа реакций могут сопровождаться ХЛ. Другим механизмом электронного возбуждения молекул продукта в темновых реакциях является распад органических перекисей. В биологических системах наиболее вероятно образование перекисей при взаимодействии различных субстратов с различными "формами активированного кислорода" (ФАК). Этим термином называют свободно-радикальные молекулы, образующиеся при ступенчатом восстановлении молекулярного кислорода до воды, а также синглетно возбужденный кислород.

синглетно возбужденный кислород

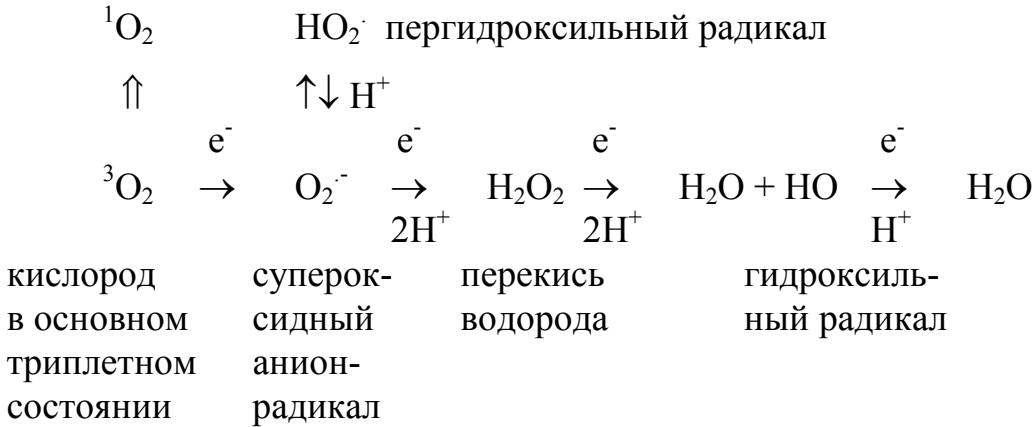
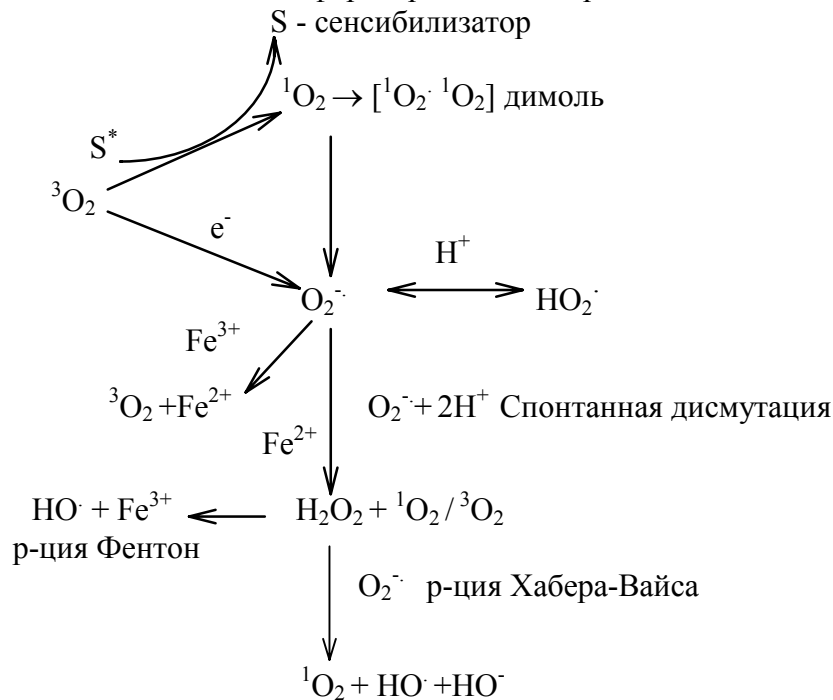


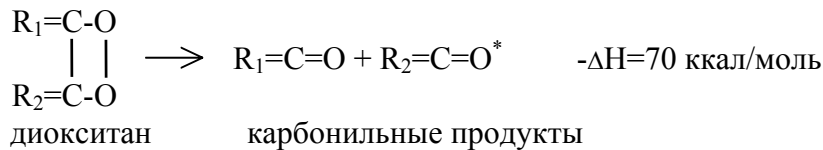
Схема образования активированного кислорода в процессах его одноэлектронного восстановления или возбуждения в синглетное состояние.

В соответствии с представленной схемой одноэлектронное восстановление кислорода до воды в процессах аэробного дыхания и окисление воды до кислорода при фотосинтезе проходит стадии, на которых образуются ФАК. ФАК обладают высокой химической активностью и принимают участие во многих важнейших биологических процессах. Чрезвычайно высокой реакционной способностью обладают молекулы синглетно возбужденного кислорода, способного образовываться на свету в присутствии сенсбилизаторов и в темновых условиях при взаимодействии анион-радикала кислорода с перекисью водорода.

Объединение всех ФАК в одну группу обусловлено тем, что в соответствии с приведенной ниже схемой появление одной из форм приводит к образованию всех остальных.

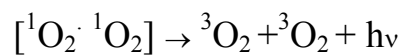


Взаимодействие синглетного кислорода с многими ненасыщенными соединениями приводит к образованию перекисных соединений класса диокситанов, распад которых может завершиться электронным возбуждением одного из карбонильных продуктов реакции:



При этом излучение кванта света в акте перехода карбонильного соединения из электронного возбужденного состояния в основное соответствует ХЛ.

Синглетно возбужденный кислород способен к собственной люминесценции при переходе в свое основное состояние (для кислорода основным состоянием является триплетное). Он может испустить квант инфракрасного излучения с длиной волны 1270 нм. В ряде ХЛ реакций (например, взаимодействие гипохлорита натрия с перекисью водорода) эмиссия света в видимой области спектра обусловлена излучением димолярного комплекса синглетного кислорода:



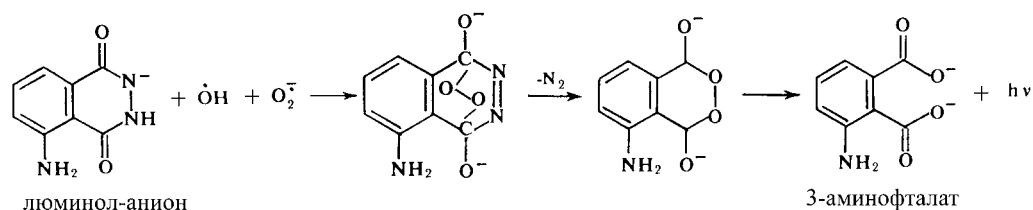
Однако протекание такого типа реакций в биологических системах маловероятно по ряду причин. Во-первых, время жизни синглетного кислорода (без учета взаимодействия с органическими молекулами) в водных системах порядка 2 микросекунд. Во-вторых, синглетно возбужденный кислород с очень высокой скоростью вступает в реакции с различными ненасыщенными соединениями. В биологических системах защиту от синглетного кислорода осуществляют главным образом каротиноиды и α -токоферол (витамин Е) - чрезвычайно эффективные тушители синглетного кислорода. В-третьих, интенсивность излучения димолей кислорода пропорциональна квадрату концентрации синглетно возбужденного кислорода, а так как его концентрация очень мала, излучением видимого света за счет димолей кислорода в биологических системах можно пренебречь. Ткани аэробно дышащих организмов имеют ферментную систему, дисмутирующую супероксидные анион-радикалы:



Стационарная концентрация $O_2^{\cdot -}$ в клетках растений в норме поддерживается на уровне $10^{-9}M$, а концентрация H_2O_2 в связи с высокой активностью каталазы и пероксидаз, разлагающих H_2O_2 , - на уровне $10^{-6}M$.

Таким образом, в биологических системах концентрация всех ФАК в норме поддерживается на очень низком уровне и может увеличиваться при некоторых патологических состояниях организма. Атака ненасыщенных соединений клетки ФАК приводит к образованию перекисных соединений, в том числе и класса диокситанов, распад которых может приводить к образованию электронно возбужденного карбонильного продукта.

ФАК в биологических системах можно обнаружить используя хемилюминесцентный индикатор - люминол (гидрозид 3-аминофталиевой кислоты). Люминол вступает в прямое химическое взаимодействие с радикалами HO^{\cdot} и $O_2^{\cdot -}$ и образует 3-аминофталат в возбужденном электронном состоянии, излучающем квант света при переходе в основное состояние:



Усиление интенсивности хемилюминесцентных реакций при добавлении к исследуемому образцу люминола указывает на присутствие в данной системе АФК.

Спонтанная ХЛ непигментированных тканей растений обусловлена, главным образом, протеканием реакций с участием ФАК. Эти реакции играют важную роль в жизнедеятельности организма. Их усиление свидетельствует об усилении окислительных процессов в организме и, в том числе, окислительном стрессе растений.

Хемилюминесцентный метод позволяет непрерывно получать информацию о скорости протекания свободнорадикального окисления в нативном организме. Исследование кинетики ХЛ позволяет судить о физиологическом состоянии организма при воздействии различных факторов среды. В частности, спонтанное свечение корней растений при действии неблагоприятных факторов может показать устойчивость растения к данному воздействию и оценить обратимость его действия.

Окислительное повреждение растений может быть вызвано рядом причин, одной из которых является осмотическое повреждение. Кинетика ХЛ корней различных растений (гороха, пшеницы, огурцов и др.) при обезвоживании представляет кривую с максимумом, время достижения которого зависит от степени обезвоживания, вида и сорта растения.

Максимальная интенсивность ХЛ может в 3 раза превосходить стационарный уровень излучения корней до обезвоживания. Это происходит при потере приблизительно 20% веса корней и сопровождается плазмолизом клеток. Еще большая потеря воды вплоть до 60% от исходного веса приводит к очень быстрому достижению максимума интенсивности ХЛ, а затем снижению ее уровня ниже контрольного. В ходе обезвоживания на начальных этапах скорость поглощения кислорода незначительно растет (105% от контроля), затем снижается до 40-50% при 60-70% обезвоживания.

Осмотический шок при действии гипертонических концентраций солей или сахаров вызывают окислительное повреждение, сопровождаемое генерацией ФАК и накоплением продуктов перекисного окисления липидов. При этом окислительное повреждение тканей растений, как правило, не приводит к увеличению суммарной скорости поглощения кислорода, что связано с ингибированием процессов дыхания. Степень окислительного повреждения при осмотическом шоке может быть оценена по кинетике спонтанной ХЛ непигментированных тканей растений и ответной реакции растения на создание гипотонических условий, что приводит к деплазмолизу клеток.

Усиление генерации ФАК в клетках растений при осмотическом повреждении происходит в процессе окисления ряда фенольных соединений, выходящих из клеток, на пекто-целлюлозных оболочках с участием пероксидазы. Такой механизм генерации ФАК целесообразен для защиты растения от внедрения паразитарной микрофлоры, так как внедрение паразита приводит к нарушению проницаемости клеток, а ФАК являются цитотоксическими агентами. Видимо, использование ФАК для защиты организма от патогенной микрофлоры - явление универсальное. Известно, что фагоциты животных до начала самого фагоцитарного акта запускают реакции генерации ФАК путем восстановления кислорода за счет НАДФН и только подействовав на мишень цитотоксическими веществами приступают к фагоцитозу.

Экспериментальная часть

Задачей настоящей лабораторной работы является практическое освоение метода регистрации ХЛ непигментированных тканей растений.

Приборы, принадлежности, реактивы

1. Хемилюминометр;
2. Шприц 10мл;
3. Фосфатный буфер рН 6,86, разбавленный дистиллированной водой 1:10;
4. КСl 0,5М, приготовленный из 1 М КСl разбавлением буферным раствором 1:1;
5. Люминол 10^{-4} М.

Устройство хемилюминометра

Хемилюминометр представляет собой чувствительный детектор светового излучения. Используемый в данной задаче хемилюминометр регистрирует одиночные кванты света. Излучение исследуемого объекта попадает на фотоэлектронный умножитель. В фотоэлектронном умножителе квант света выбивает с фотокатода электрон, который под действием электростатического поля приобретает кинетическую энергию, достаточную для выбивания 3-4 электронов из промежуточного электрода (динода). 3-4 электрона, выбитые с первого динода электростатическим полем, направляются на следующий динод, из которого выбивают соответственно 9-16 электронов и эти электроны направляются на следующий динод. Обычно фотоэлектронный умножитель имеет 9-11 динодов и в ответ на поглощенный квант создает на аноде импульс тока около 10^9 электронов. Такой импульс можно относительно просто зарегистрировать. Однако, фотокатод фотоэлектронного умножителя может испускать электроны и без попадания кванта света за счет тепловых флуктуаций. Это явление называется термоэлектронной эмиссией. Термоэлектронная эмиссия накладывает ограничения на предельную чувствительность хемилюминометра. Предельная чувствительность хемилюминометра может достигать десятков квантов в секунду или 10^{-15} Вт.

Электрический сигнал с фотоэлектронного умножителя в виде импульса отрицательной полярности подается на вход широкополосного усилителя и, усиленный в несколько тысяч раз, поступает на амплитудный дискриминатор. Режим работы амплитудного дискриминатора выбирается так, чтобы пропустить только импульсы, возникшие за счет испускания одного электрона с фотокатода фотоэлектронного умножителя, и отсеять прочие шумовые импульсы. Прошедшие через дискриминатор импульсы регистрируются пересчетным прибором в дискретной форме, а также измерителем скорости счета в аналоговой форме для регистрации на самопишущем потенциометре. Для работы фотоэлектронного умножителя на него подается высокое напряжение (около 1000 В). Кювета с исследуемым образцом помещают в светонепроницаемую камеру, в которой имеется затвор для перекрывания фотоэлектронного умножителя. Для введения и удаления растворов используют длинную иглу шприца. Введение и удаление растворов производится шприцем.

Порядок включения прибора

1. Поставить рукоятку затвора камеры в положение «закрыто»
2. Включить тумблер «накал» на нижней панели прибора.
3. Включить тумблер «сеть» высоковольтного выпрямителя.
и **НЕ РАНЬШЕ, ЧЕМ ЧЕРЕЗ 3 МИНУТЫ**
4. Включить тумблер «анод» на нижней панели прибора.
5. Включить переключатель «высокое напряжение» высоковольтного выпрямителя.

Методика

1. В присутствии преподавателя при закрытой дверце камеры и закрытой шторке камеры включить хемиллюминометр (см. выше).
2. Провести измерение «темнового фона», соответствующего уровню термоэлектронной эмиссии с фотоумножителя.
3. Открыть дверцу камеры и поместив в камеру пустую кювету для объекта, закрыть дверцу камеры.
4. Открыть шторку и измерить интенсивность свечения пустой кюветы. Если уровень этого свечения превысит 20% от «темнового фона», закрыть шторку, извлечь кювету и тщательно промыть ее водой.
5. Добившись необходимой чистоты кюветы поместить в нее корни 2-3 растений гороха и установить кювету в камеру перед окном фотоумножителя. Ввести в кювету трубочку от шприца для введения растворов. Закрыть крышку камеры и открыть шторку для регистрации интенсивности ХЛ корней с выходом на самописец. **ВПЕРЕДЬ ДО ОКОНЧАНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА КРЫШКУ КАМЕРЫ НЕ ОТКРЫВАТЬ! ВО ВРЕМЯ ЗАМЕНЫ РАСТВОРОВ ШТОРКУ КАМЕРЫ ДЕРЖАТЬ ЗАКРЫТОЙ!**
6. В течение 5 минут измерять интенсивность свечения корней. Затем, предварительно закрыв шторку, ввести в кювету шприцем не открывая камеры 10 мл буферного раствора рН 6,86 и открыть затвор. Регистрировать ХЛ корней до выхода интенсивности на стационарный уровень, но не более 20 мин.
7. Закрыв шторку камеры шприцем извлечь из кюветы буферный раствор и заменить его на 10 мл 0,5 М раствора КСl. Регистрировать кинетику ХЛ 20 минут. (За это время проходит реакция плазмолиза в ответ на осмотический шок, вызванный гипертонической концентрацией солевого раствора.)
8. Закрыв шторку камеры заменить солевой раствор в кювете на 10 мл буферного раствора и регистрировать кинетику ХЛ 10 мин., после чего добавить 2 мл раствора люминола и зарегистрировать эффект его воздействия на ХЛ корней.
9. Закрыть шторку камеры, открыть крышку, извлечь кювету и промыть ее.
10. Выключить прибор. (Порядок выключения обратный включению.)