

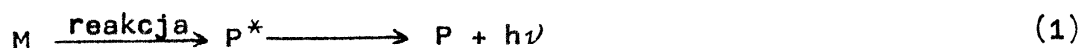
Janusz Sławiński

EMISJE FOTONOWE W BADANIACH UKŁADÓW BIOLOGICZNYCH*

Problematyka emisji fotonowych zakresu optycznego z układów biologicznych (ultrasłaba luminescencja, biochemiluminescencja) omawiana była ostatnio w szeregu artykułów przeglądowych [5, 26, 31] i w wydawnictwach książkowych [1, 19, 27, 33]. Niniejszy artykuł, poza szkicowym przypomnieniem podstaw zjawiska, sygnalizuje aktualne problemy badań emisji fotonowych w aspekcie ich związku z procesami i strukturami biologicznymi oraz podaje wybrane przykłady zastosowań w różnych dziedzinach.

1. ENERGETYKA, SPEKTROSKOPIA ORAZ WŁAŚCIWOŚCI I FUNKCJE EMISJI FOTONOWYCH W UKŁADACH BIOLOGICZNYCH

Emisja promieniowania elektromagnetycznego w zakresie spektralnym od bliskiej podczerwieni do ultrafioletu C ($\lambda = 1200-180 \text{ nm}$) jest związana z relaksacją radiacyjną najniższych stanów elektronowo wzbudzonych singletowych i tripletowych do stanów podstawowych. Z bioenergetycznego punktu widzenia żywe organizmy są „maszynami” chemodynamicznymi, pompowanymi energią swobodną G egzenergetycznych reakcji chemicznych, przekształcających substraty M w produkty tych reakcji P :

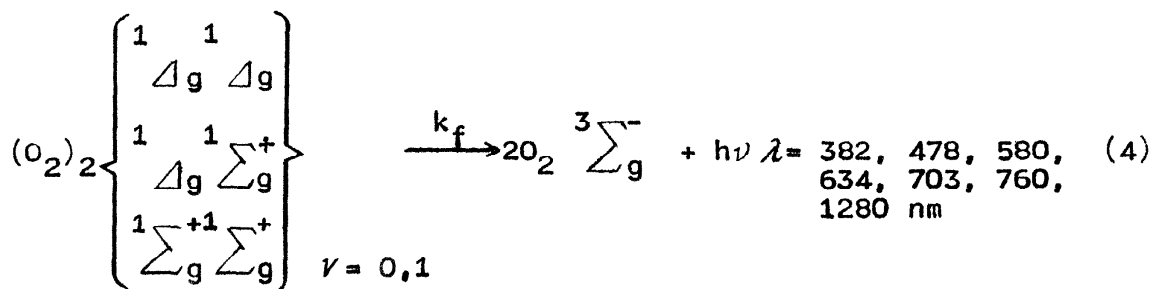
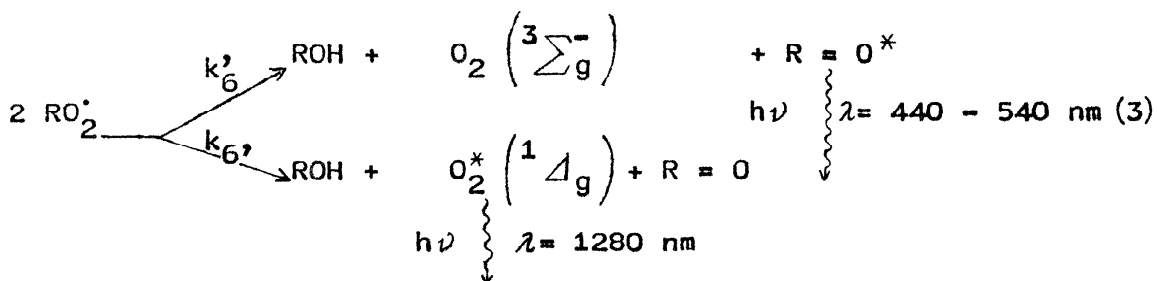


$$- \Delta G = \Delta H - T\Delta S \geq h\nu = - \frac{hc}{\lambda} \quad (2)$$

* Referat wygłoszony w Szkole Naukowej „Spektroskopowe i strukturalne badania materiałów i układów o podstawowym znaczeniu dla biologii i medycyny”, w Ustroń-Zawodzie, 1985.03.04-13.

gdzie ΔH oznacza zmiany entalpii reakcji (1), a ΔS zmiany entropii. Efektywne wzbudzenie elektronowe w fazie skondensowanej, właściwej układom biologicznym, wymaga dostarczenia energii 100–640 kJ/mol, tj. 1–8 eV, w czasie krótszym od średniego czasu oscylacji lub czasu przebywania produktów w otoczce solwatacyjnej („klatce rozpuszczalnika”) rzędu 10^{-11} s. Wymagania te spełniają cztery typy reakcji chemicznych, przedstawione schematycznie w tab. 1.

Małe wydajności kwantowe $\Phi = 10^{-10} - 10^{-14}$ (liczba fotonów: liczba cząsteczek M, które przereagowały w reakcji (1) oraz skrajnie małe natężenia strumieni spontanicznej ultrasłabej luminescencji $I = 1-10^4$ fotonów/cm²·s są przyczyną niedostatecznego poznania właściwości spektroskopowych emisji fotonowych z układów biologicznych. Zgodnie z przewidywaniami teoretycznymi dane doświadczalne wskazują, że pierwotnymi produktami reakcji, generowanymi w stanach elektronowo-oscyłacyjnie wzbudzonych, są związki karbonylowe $^{1,3}(=C=O)^*$ oraz tlen cząsteczkowy w stanach wzbudzonych singletowych $^1\Delta_g$ i $^1\Sigma_g^+$:



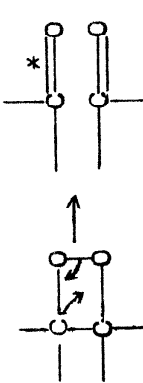
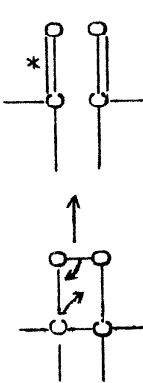
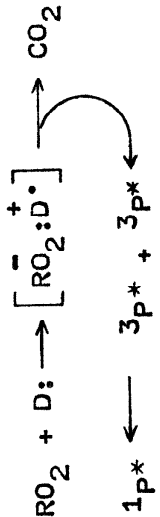
Ważną rolę mogą odgrywać procesy anihilacji, zachodzące między wzbudzonymi stanami triplet-triplet (TTA):



procesy fluorescencji ekscimerowej, np. z dimoli $(\text{O}_2)_2^*$ (procesy 4), węglowodorów policyklicznych i zasad azotowych w DNA [1,19]. W ży-

T a b e l a 1

Podstawowe typy reakcji chemicznych spełniających warunki efektywnego chemiowzbudzenia

Typ reakcji	Uproszczony przebieg reakcji	Efekt energetyczny -ΔH, kJ/mol
Rekombinacja (dysmutacja) rodników nadtlenowych	$RO_2^{\cdot} + RO_2^{\cdot} \longrightarrow R=O^* + O_2^* + ROH$ 	350 - 420
Rozkład nadtlenków typu dwuoksyetanu		320 - 380
Luminescencja indukowana chemiczną wymianą elektronu (ang. CIEEL)	$RO_2 + D: \longrightarrow [RO_2:D^{\cdot+}] \longrightarrow CO_2$ $1p^* \longleftarrow 3p^* + 3p^*$ 	~400
Przenoszenie elektronu (adiabatyczne) z do- nora D na akcep- tor A	$D(e^-) + A \longrightarrow D^* + A \text{ lub } D + A^*$	~320

wej komórce jest wiele wydajnie fluoryzujących związków, np. flawin, chlorofilów, reszt tryptofanowych w białkach itp. które spełniają rolę akceptorów (A) energii wzbudzenia. Istnieje więc duże prawdopodobieństwo przenoszenia energii z pierwotnych produktów wzbudzenia P^* na akceptory A z udziałem mechanizmu rezonansowego (Foerster) lub wymiennego (Dexter):



Z tym procesem jest związana wtórna emisja, charakteryzująca się własnościami spektralnymi akceptora A, lecz o natężeniu $I_P + I_A = 10-10^4$ razy większym od I_P . Ten efekt wzmocnienia ułatwia wykrywanie i badanie słabych emisji układów biologicznych.

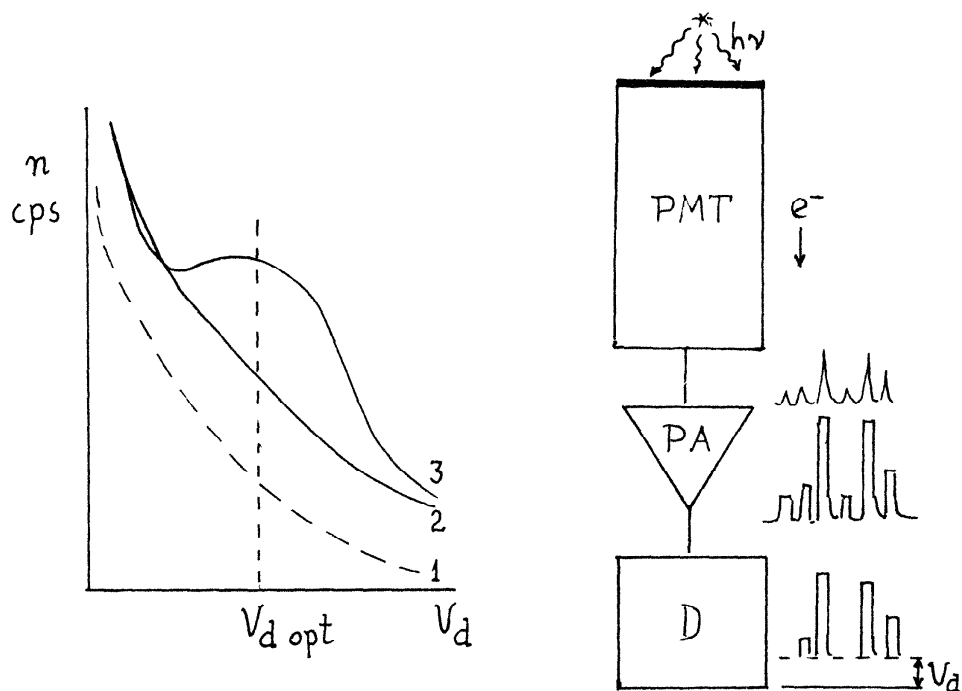
Integralne (I) i spektralne natężenie ($I\lambda$) emisji, charakteryzujący czasowe emisji I ($I\lambda$) = $f(t)$, a niekiedy i rozkład spektralny $I\lambda = f(\lambda)$ odzwierciedlają stan fizjologiczny organizmu. Tak np. procesy chorobowe nowotworowe, zakażenia wirusowe i bakteryjne, inwazje pasożytów - zmieniają natężenie emisji, co pozwala niekiedy wykryć wczesne stadia procesu chorobowego. Gdy organizm jest poddany warunkom stresowym, obserwuje się silne zmiany natężenia jego emisji fotonowej, np. charakterystyczne maksima w pewnych zakresach temperatur, ciśnienia osmotycznego, stężenia ksenobiotyków, tlenu itp. Gdy czynnik stresowy powoduje nieodwracalne zmiany w strukturach i funkcjach organizmu prowadzące do jego śmierci, następuje gwałtowna emisja promieniowania określana spektakularnym mianem „błysku śmierci” (promieniowanie degradacyjne). Bliższe omówienie tych zagadnień znaleźć można w najnowszej literaturze [1, 19, 27, 33].

Czy spontaniczne, ultrasłabe promieniowanie spełnia określone funkcje biologiczne? Większość danych doświadczalnych sugeruje, że zjawisko to jest produktem ubocznym metabolizmu, związanym z niepełnym wykorzystaniem energii elektronów przenoszonych przez ogniwa łańcucha oddechowego. Nieznaczna część ($\sim 6\%$) elektronów „wycieka” w tych miejscach, gdzie różnica potencjałów oksydoredukcyjnych ΔE znacznie przewyższa potencjał fosforylacji, tj. akumulowania energii w formie ATP. Akty emisji stanowią więc „szum fotonowy”, odzwierciedlający sporadyczne „katastrofy energetyczne” niedoskonałego układu bioenergetycznego (tzw. imperfection theory).

Ostatnio wzrasta liczba prac wskazujących na możliwość odgrywania funkcjonalnej roli przez endogennie generowane stany elektronowo wzbudzone [1] i promieniowanie elektromagnetyczne, w szczególności jego koherentną składową [19]. Obszerniejsze omówienie tych procesów wykracza poza ramy niniejszego referatu. Pewne aspekty koncepcji kontrolno-informacyjnej roli endogennego promieniowania układów biologicznych są krótko wymienione w następnej części artykułu.

2. APARATURA I METODYKA BADAŃ.

Do pomiarów integralnego i spektralnego natężenia promieniowania emitowanego z obiektów biologicznych stosuje się technikę zliczania pojedynczych fotonów (SPC). Zasadniczą rolę spełnia dobry fotopowielacz o minimalnym prądzie ciemnym (liczbie impulsów „ciemnych” n_N), dużej czułości spektralnej fotokatody η w możliwie szerokim zakresie widmowym (175-900 nm) oraz posiadający pla-



Rys. 1. Schematyczne przedstawienie zasady pomiarów ultrasłabej luminescencji metodą zliczania pojedynczych fotonów. Z lewej: szybkość zliczania fotonów (impulsów jednoelektronowych) n w funkcji napięcia dyskryminacji V_d : 1 - tło, 2, 3 - sygnał + tło. Z prawej: ideowy schemat funkcjonowania fotopowielacza (PMT), przedwzmacniacza szerokopasmowego (PA) oraz dyskryminatora (D)

teau lub maksimum funkcji szybkości zliczeń impulsów sygnału n_S w zależności od napięcia dyskryminacji V_d (rys. 1). Funkcja:

$$M_t = \eta(\lambda) F(V_d) A_c \quad (7)$$

opisuje warunki optymalizacji stosowania metody SPC. A_c jest efektywną powierzchnią fotokatody, określoną przez kąt zbierania fotonów, odległość fotokatody od próbki i aktualną powierzchnię fotokatody. Funkcja $\eta(\lambda)$ określa wydajność kwantową fotokatody w zależności od długości fali padającego promieniowania, a wyrażenie:

$$F(V_d) = D_s(V_d) T^{\frac{1}{2}} / [\langle n_N \rangle D_N(V_d)]^{\frac{1}{2}} \quad (8)$$

warunki dyskryminacji sygnałów. V_d oznacza wybraną amplitudę napięcia dyskryminacji impulsu (rys. 1), $\langle n_N \rangle$ średnią szybko zliczania impulsów szumu, T czas pomiaru (próbkiowania), a $D_s(V_d)$ i $D_N(V_d)$ odpowiadają prawdopodobieństwu wystąpienia zliczanych impulsów powyżej progu V_d , spowodowanych odpowiednio pojedynczymi fotoelektronami i elektronami szumu. Optymalizacja warunków wymaga, aby:

$$D_s(V_d)/D_N(V_d)^{\frac{1}{2}} \quad (9)$$

było maksymalne, a $A_c(\langle n_N \rangle)^{\frac{1}{2}}$ również maksymalne. Tym wymogom odpowiadają nieliczne typy fotopowielaczy, selekcjonowane spośród np. 9658 EMI (Anglia), R-818 Hamamatsu (Japonia), FEU-130 „Quantacon” (ZSRR) i C 31034 „Quantacon” RCA (USA). Ostatnio pojawiły się komercyjne urządzenia do pomiarów natężenia i rozkładu widmowego, wyposażone w komplet filtrów granicznych lub interferencyjnych z programowaną temperaturą i zestawem kulet dla próbek o różnej konsystencji i wielkości, np. sterowany mikroprocesorem aparat „Chemiluminescence Counter TD-7” japońskiej firmy Showa Denko [10]. Ważne jest również użycie szybkich wzmacniaczy (100 MHz) „kwadratowych”, wydawnie zwiększających stosunek n_S/n_N przy dobrej separacji poszczególnych jedno-fotonowych impulsów oraz materiałów o małej zdolności emisji fotonów i elektronów dla konstrukcji światłoszczelnej kamery. Zagadnienia te są obszerniej opisane w [10, 17, 18].

Szybki postęp w zakresie detekcji i analizy słabych promieniowań rokuje nadzieję na lepsze poznanie mechanizmów emisji fotonów

wych i ich związku ze strukturami i procesami biologicznymi oraz możliwości zastosowań dla szybkiej, nie niszczącej diagnostyki materiałów biologicznych, śledzenia procesów fizjologicznych itp.

3. PROBLEMY KONCEPCYJNE I METODOLOGICZNE

W aktualnej problematyce badań emisji fotonowych w układach biologicznych można wyróżnić trzy aspekty o szczególnej doniosłości:

- 1) określenie stopnia koherencji endogennego promieniowania,
- 2) ilościową ocenę zmian jakim podlega promieniowanie na drodze od pierwotnych centrów luminescencji do detektora poprzez niejednorodny ośrodek biologiczny,
- 3) opracowanie metodologii badań generowania stanów elektrownowo wzbudzonych i emisji fotonowej w oddziaływaniach międzycząsteczkowych oraz konstrukcję adekwatnych modeli fizycznych.

3.1. PRÓBY OKREŚLENIA STOPNIA KOHERENCJI SŁABYCH EMISJI

Koncepcja informacyjno-kontrolnej roli słabych emisji fotonowych w regulacji procesów wewnątrz i zewnątrz komórkowych implikuje częściową koherencję endogennego promieniowania. Wynika ona ze spektroskopowej i termodynamiczno-statystycznej analizy ultrasłabej luminescencji oraz prac F r ö h l i c h a na temat dalekozasięgowych, kooperacyjnych oddziaływań elektromagnetycznych [9, 15, 19, 20]. Na możliwość uzyskania promieniowania spójnego w układach biologicznych wskazują wyniki obliczeń teoretycznych oraz nieliczne prace doświadczalne, zmierzające do otrzymania takiego promieniowania w reakcjach elektrochemiluminescencji w cienkich warstwach. Struktury biologiczne, jak np. szczelina międzysynaptyczna lub przestrzeń między wewnętrzną a zewnętrzną błoną mitochondrium, spełniają dobrze warunki niezbędne dla tego rodzaju procesów [4]. Doniesiono też o emisji nieliniowego promieniowania w podczerwieni z oddechu człowieka [32] oraz z pary wodnej dotowanej feromonami niektórych owadów [7].

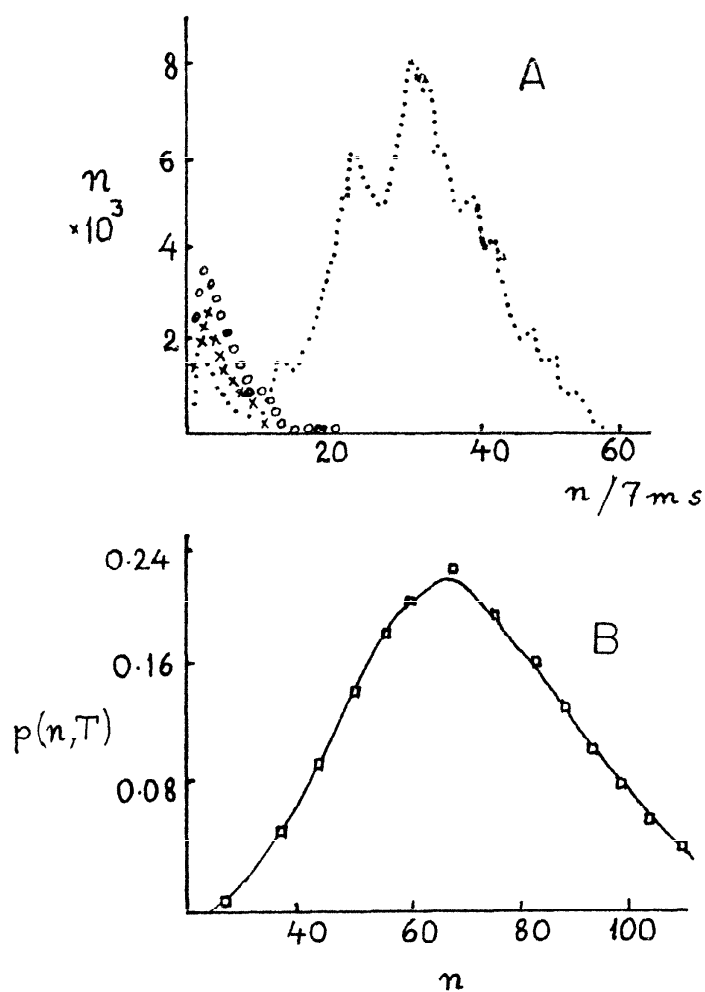
Skrajnie małe natężenia spontanicznej luminescencji z żywych organizmów uniemożliwiają zastosowanie klasycznych metod interferencyjnych. Zaproponowano dwie metody oceny stopnia koherencji słabych emisji:

- 1) Badanie statystyki szybkości zliczania pojedynczych foto-

nów, co pozwala obliczyć rozkład prawdopodobieństwa zliczenia m fotonów w czasie próbkowania t ($t < t_{koh}$). Dla promieniowania monochromatycznego całkowicie koherentnego należy oczekiwać rozkładu Poissona:

$$P_m(t) = \frac{\bar{m}^m}{m!} \exp(-\bar{m}), \quad (10)$$

natomiast w przypadku promieniowania całkowicie chaotycznego rozkładu Gaussa (normalnego):



Rys. 2. Rozkłady prawdopodobieństwa zliczania fotonów emitowanych przez różne obiekty biologiczne. A - rozkład zliczania fotonów z oddechu ludzkiego: palacza tytoniu (.....), osobnika niepalącego (oooo) oraz tła kamery pomiarowej (xxxxx) obliczony wg statystyki Bernoulli [32]. B - rozkład fotonów z kiełkujących nasion ogórka: linia - teoretyczna krzywa, -□-□-□- punkty doświadczalne [18]

$$P_m(t) = \frac{\bar{m}^m}{(1 + \bar{m})^{1+m}}, \quad (11)$$

gdzie $\bar{m}$ jest wartością średnią, a m wartością pojedynczego zliczenia [18]. Na rys. 2 pokazano przykładowo rozkłady zliczeń impulsów jednoelektronowych [18, 32]. Badanie rozkładu fluktuacji szybkości zliczania fotonów oraz przedstawianie wyników w formie histogramu dostarcza dodatkowych informacji o stopniu jednorodności procesów generowania fotonów oraz o ich względnym udziale ilościowym. Ponadto pozwala obliczyć z pojedynczego pomiaru takie parametry statystyczne jak wartość średnia, odchylenie standardowe, momenty itp.

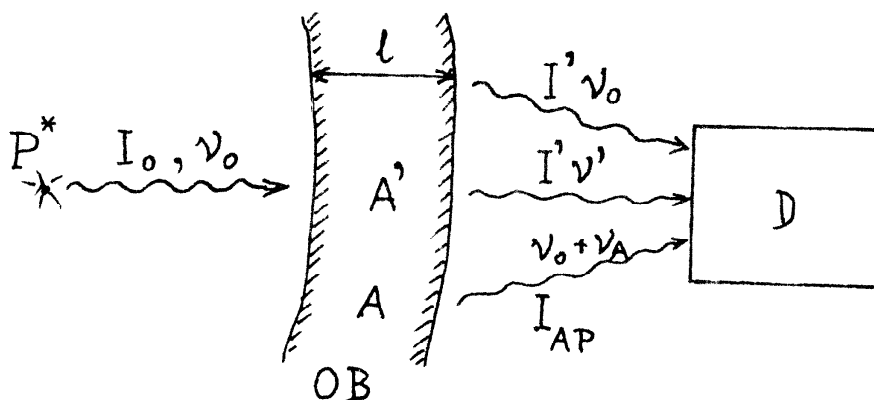
2) Analiza krzywej kinetycznej, opisującej wolno zanikającą luminescencję indukowaną uprzednim naświetleniem próbki światłem polichromatycznym. W modelu Li i Poppa [12, 13] zanik emisji oscylatora sprzężonego koherentnie z emitowanym polem spełnia równanie hiperboli:

$$I_\lambda(t) = A_\lambda (t - t_0)^{-\beta} \quad 1 < \beta < 3, \quad (12)$$

gdzie t_0 oznacza czas naświetlania próbki, t czas obserwacji, a parametr A_λ zależy od λ oraz od wartości β . Dotychczas wykonano zaledwie kilka doświadczeń w celu weryfikacji powyższej hipotezy. Zanik hiperboliczny, potwierdzający koherentność indukowanej emisji, obserwowano w ściśle określonych fazach mejozy z jednorodnych tkanek, np. mikrosporocytów modrzewia w sześciu fazach mikrosporogenezy [8]. Komórki tkanek nowotworowych wykazują wyraźne odstępstwa od zaniku hiperbolicznego oraz duże zróżnicowanie wykładnika β [23]. Fotoindukowana emisja fotonowa (niefotosyntetyczna) - jako zjawisko uniwersalne, lecz odkryte niedawno - wymaga intensywnych badań teoretycznych i doświadczalnych. Może stanowić podstawę dla opracowania nowych metod diagnostycznych w medycynie, gdyż wiąże się z uporządkowaniem struktur biologicznych i synchronizacją zachodzących w nich procesów. W kraju badania stopnia koherencji słabych emisji fotonowych są prowadzone od niedawna w Zakładach Fizyki i Biologii UMK w Toruniu, w Instytucie Fizyki WSP w Krakowie i Akademii Rolniczej w Szczecinie.

3.2. MODYFIKACJA WŁAŚCIWOŚCI PROMIENIOWANIA W OŚRODKU BIOLOGICZNYM

Promieniowanie elektromagnetyczne generowane wewnątrz komórki, przechodząc przez zróżnicowany ośrodek biologiczny, podlega różnorodnym procesom mogącym dramatycznie zmienić jego właściwości. Natężenie i rozkład widmowy promieniowania padającego na detektor ulegają zmianie w wyniku absorpcji na drodze od źródła do detektora (rys. 3):



Rys. 3. Schemat przedstawiający zmiany, jakim podlega promieniowanie emitowane przez pierwotne emiter P^* przechodzące przez niejednorodny ośrodek biologiczny (OB) do detektora D. Patrz tekst

$$I' = I_0 \frac{1 - \alpha}{1 - \alpha I_0'} \quad (13)$$

gdzie:

$$\alpha I_0 = \int_0^\infty L_0(\nu) (1 - 10^{-\epsilon(\nu)} [A'] l) d\nu \quad (14)$$

Wyraz podcałkowy określa stopień nakrywania się widma emisji i absorpcji. Z uwagi na zawartość naturalnych fluoroforów w strukturach i plazmie komórki, należy liczyć się z możliwością chemiluminescencji aktywowanej (przenoszenia energii wzbudzenia, równanie (6)), która zmienia pierwotne właściwości luminescencji:

$$I_{PA} = \eta_P [P^*] + \eta_A [A^*] = (\eta_P + \eta_{PA}) \eta_P^{ex} w. \quad (15)$$

Symbole η z indeksem oznaczają wydajności kwantowe luminescencji odpowiednio P, A oraz wydajność przenoszenia energii $P^* \rightarrow A$, a w jest szybkością elementarnej reakcji „pompującej” obsadzanie stanu elektronowo wzbudzonego. W omawianych badaniach należy też uwzględnić procesy wielokrotnego rozpraszania promieniowania oraz interferencji, które mogą zarówno zwiększać jak i zmniejszać stopień koherencji [19]. Efekty te wymuszają konieczność dokładnej analizy mechanizmów oddziaływania promieniowania z ośrodkiem biologicznym oraz konstrukcję takich modeli, które pozwalają odtworzyć charakterystykę pierwotnego (endogennego) promieniowania wytwarzanego wewnątrz struktur biologicznych. Dotyczy to zwłaszcza silnie upigmentowanych komórek takich jak erytrocyty, chloroplasty i melanocyty, które pochłaniają niezwykle silnie w określonych zakresach widma. Można przypuszczać, że np. melanocyty absorbują prawie całkowicie składową ultrafioletową promieniowania generowanego w procesach melanogenezy i degradacji melanin oraz metabolizmu, a więc działają jak „optyczne czarne dziury” [25].

3.3. ODDZIAŁYWANIA MIĘDZYCZĄSTECZKOWE A WZBUDZENIE ELEKTRONOWE

Procesom penetracji wody do sieci przestrzennej biopolimerów, okrywy nasiennej lub błony zarodników grzybów [28, 29] i reorientacji dipoli wody wewnątrz otoczek solwatacyjnych związków silnie fluoryzujących [16] towarzyszy ultrasłaba emisja fotonowa o wydajności kwantowej rzędu 10^{-14} . Podobnie jak w przypadku krystaloluminescencji kryształów molekularnych, energia pojedynczych oddziaływań jest wielokrotnie mniejsza od wartości hc/λ . W wymienionych procesach nie mają miejsca silnie egzoenergetyczne reakcje, jak np. wymienione w tab. 1, przeto nie jest spełnione energetyczne kryterium chemiwbudzenia (równanie (2)). Dane te wskazują na potrzebę systematycznego badania kooperacyjnych oddziaływań międzycząsteczkowych, prowadzących do wzbudzenia elektronowego. W szczególności interesujące są następujące procesy:

- 1) synchroniczne, lawinowe wstrzykiwanie acetylocholiny do przestrzeni synaptycznej oraz szybka hydroliza tego związku, zachodząca w dużym gradiencie pola elektrycznego rzędu 10^6 V/m,
- 2) relaksacja superhelikalnych form DNA do formy zrelaksowanej [22] oraz
- 3) kooperacyjne oddziaływanie dipoli wody z makrocząsteczkami

i ultrastrukturami komórkowymi, prowadzące do „równoczesnego” ($t < 10^{-11}$ s) tworzenia kilku słabych wiązań z możliwością sumowania ich energii w metastabilnych stanach wzbudzonych. Badania wymienionych i innych procesów międzycząsteczkowych, będących źródłem wzbudzenia elektronowego, są związane z poważnymi trudnościami metodologicznymi i technicznymi.

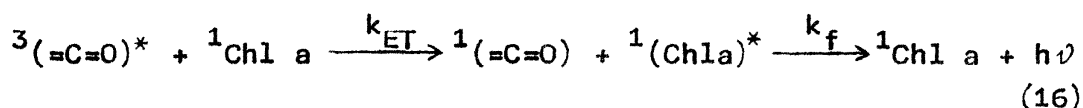
4. ZASTOSOWANIA EMISJI FOTONOWYCH (WYBRANE PRZYKŁADY)

4.1. DETEKcja WZBUDZONYCH STANÓW TLENU CZĄSTECZKOWEGO I ZWIĄZKÓW KARBONYLOWYCH

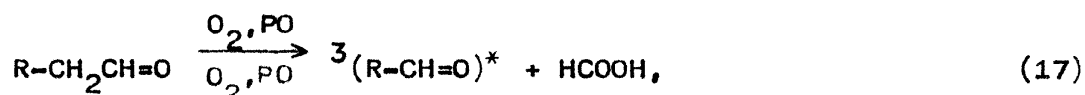
Detekcja $^1O_2^*$ i dimoli $^1(O_2)_2^*$ generowanych w procesach biochemicznych polega na badaniu widm emisji o charakterystycznych częstościach przejść (równanie (4)) z zastosowaniem odpowiednio czułych w czerwieni i podczerwieni detektorów, np. diod germanowych i krzemowych lub fotopowielaczy z fotokatodą typu S-1, stosowaniu D_2O jako rozpuszczalnika o długim czasie życia $^1O_2^*$ oraz wygaszaczy i pułapek $O_2(^1\Delta_g)$. Obserwacja przejść 0-0 cząsteczki $O_2(^1\Delta_g)$ z udziałem wibracyjnych stanów rozpuszczalnika solwatującego O_2 pozwoliła ustalić ponad wszelką wątpliwość tworzenie $^1O_2^*$ w enzymatycznych reakcjach rozkładu i aktywacji H_2O_2 z udziałem katalazy i peroksydaz [11]. Wiele danych doświadczalnych przemawia również za powstawaniem $^1O_2^*$ w enzymatycznych i nieenzymatycznych reakcjach utleniania lipidów w błonach komórkowych [5, 10, 33]. Spektroskopia 1O_2 okazała się użyteczna nawet w tak niekorzystnych optycznie układach jak modelowe procesy tworzenia i degradacji melanin, w których wykazano generowanie dimoli $^1\Delta_g$ $^1\Delta_g$ [25]. Emisyjne metody detekcji tlenu singletowego i odpowiednia aparatura są stosowane w Katedrze Fizyki Akademii Rolniczej w Poznaniu oraz Instytucie Fizyki Politechniki Szczecińskiej.

Prawdopodobieństwo generowania związków karbonylowych $^3(=C=O)^*$ we wzbudzonym pierwszym stanie tripletowym jako produktów reakcji samoutleniania i enzymatycznego utleniania lipidów oraz ksenobiotyków, np. rakotwórczych węglowodorów aromatycznych w błonach komórkowych, jest większe niż w stanach singletowych ze zrozumiałych powodów energetycznych. Jednak wykrycie i oszacowanie stężenia $^3(=C=O)^*$ sprawia trudności, gdyż wartości stałej szybkości relaksacji radiacyjnej k_2 są małe, a dominują procesy gaszenia przez

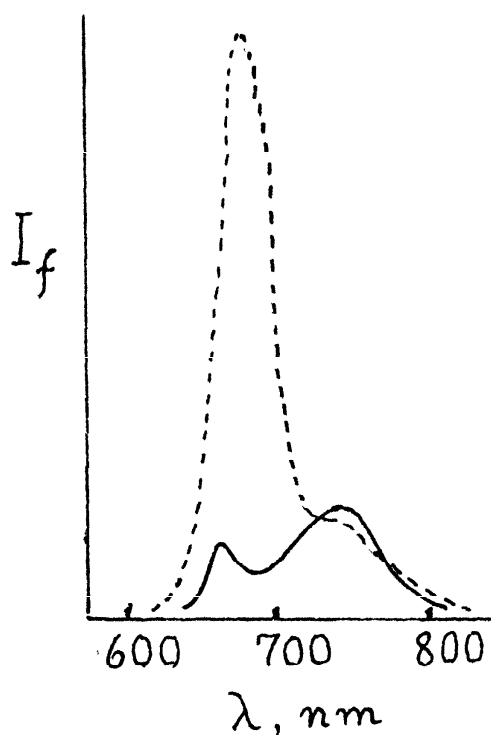
$O_2(^3\Sigma_g^-)$ oraz inne związki o charakterze wygaszaczy, obecne w komórce. Ostatnio zaproponowano użycie chlorofilu a jako wydajnego akceptora energii stanów $^3(=C=O)^*$, charakteryzującego się dużą wartością η_f , stałej $k_{ET} \cdot \tau_D = 6 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ oraz małą energią stanu $^1S^*$ [6]:



τ_D oznacza właściwy czas życia donora energii, który w przypadku aldehydów tworzących się w reakcjach utleniania ich wyższych homologów z udziałem peroksydazy (PO):



wynosi 10^{-5} – 10^{-2} s. Oszacowane stąd wartości k_{ET} są rzędu 10^7 – $10^{10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ i dlatego przenoszenie energii skutecznie konkuruje z procesami gaszenia. Jak pokazano na rys. 4, chlorofil a zagęszczony



Rys. 4. Widmo fluorescencji 10 μM roztworu chlorofilu a w buforze fosforanowym pH 7,4 (—) oraz w mikrosomach (1 mg białka/ml roztworu (---)). Czułość rejestracji jest 90 razy większa dla — niż dla ---. $\lambda_{wzb} = 440 \text{ nm}$ [6]

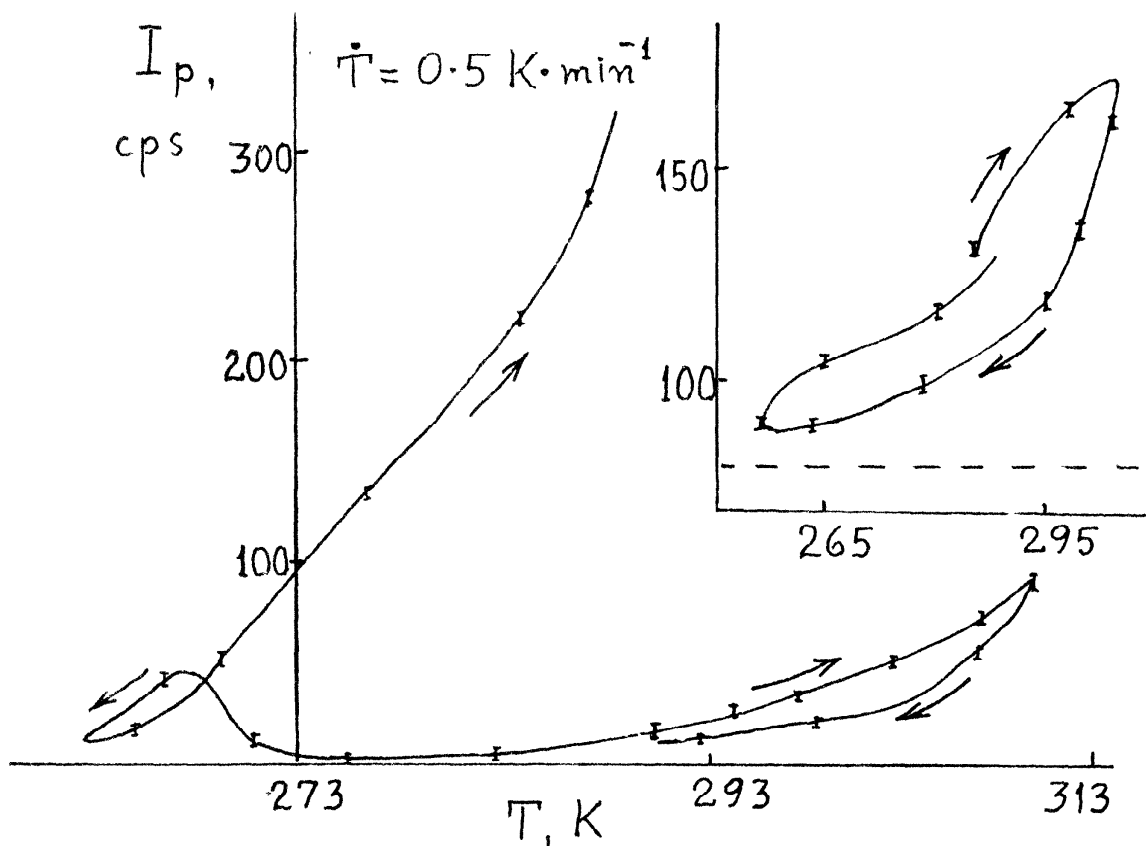
w mikrosomach lub zaadsorbowany na powierzchni białek wykazuje prawie 100-krotnie większą wartość natężenia fluorescencji monomero-wej z maksimum przy 682 nm niż Chl a w roztworach molekularnych. Okoliczność ta znakomicie ułatwia lokalizację $^3(=C=O)^*$ w strukturach biologicznych i oszacowanie wydajności generowania η_P^{ex} . Mierzając widma emisji w szerokim zakresie spektralnym z roślin etiolowanych (bezechlorofilowych) oraz zielonych, udało się już wcześniej wykazać w naturalnych warunkach in vivo efektywne przenoszenie energii wzbudzenia elektronowego z pierwotnych produktów lumineszujących w pasmach 500, 560 i 660 na chlorofil emitujący w paśmie 660-760 nm [30]. Kompleksy Eu^{3+} z tetracykliną okazały się również skutecznymi akceptorami i wydajnymi emiterami, zwiększając o trzy rzędy wielkości wykrywalność $^3(=C=O)^*$ powstających w reakcjach utleniania lipidów [24].

4.2. DIAGNOSTYKA ŻYWOTNOŚCI I ODPORNOŚCI ORGANIZMÓW

Integralne natężenie ultrasłabej luminescencji komórek, organizmów lub otrzymanych z nich homogenatów zależy od aktywności procesów metabolicznych, przy czym w optymalnych warunkach zależność ta może być liniowa. Stwierdzono statystycznie istotną korelację między natężeniem lub sumą świetlną ($\sum I = \int_{t=0}^{t=\infty} I dt$), a energią kiełkowania zarodników grzybów i nasion [28, 29] lub aktywnością i liczebnością bakteriofagów w procesach fagocytozy [2].

„Odpowiedź fotonowa” żywego organizmu na zmiany temperatury T , tj. funkcja $I = f(T)$, może stanowić źródło informacji o odporności organizmu na szybkość i zakres zmian T . Rejestrując natężenie świecenia w funkcji T , zmieniającej się ze stałą szybkością $\dot{T} = \text{const}$ w dostatecznie szerokim zakresie jednego cyklu temperaturowego, otrzymuje się tzw. nisko- i wysokotemperaturowe maksimum emisji oraz krzywe „histerezy” (rys. 5). Maksima te charakteryzują zdolności termoadaptacyjne organizmu i są wykorzystywane w selekcji nowych gatunków i odmian roślin uprawnych [14]. Powierzchnia zawarta wewnątrz krzywej „histerezy” w pełnym cyklu T może być analizowana w kategoriach termodynamiki układów otwartych i stanowić miarę naruszenia homeostazy organizmu [21].

Badanie opóźnionej luminescencji fotosyntetycznej może znaleźć rozległe zastosowania praktyczne. Pomiar natężenia składowej sekundowej z fotoukładu 2 (PS 2), z maksimum emisji ok. 685 nm w

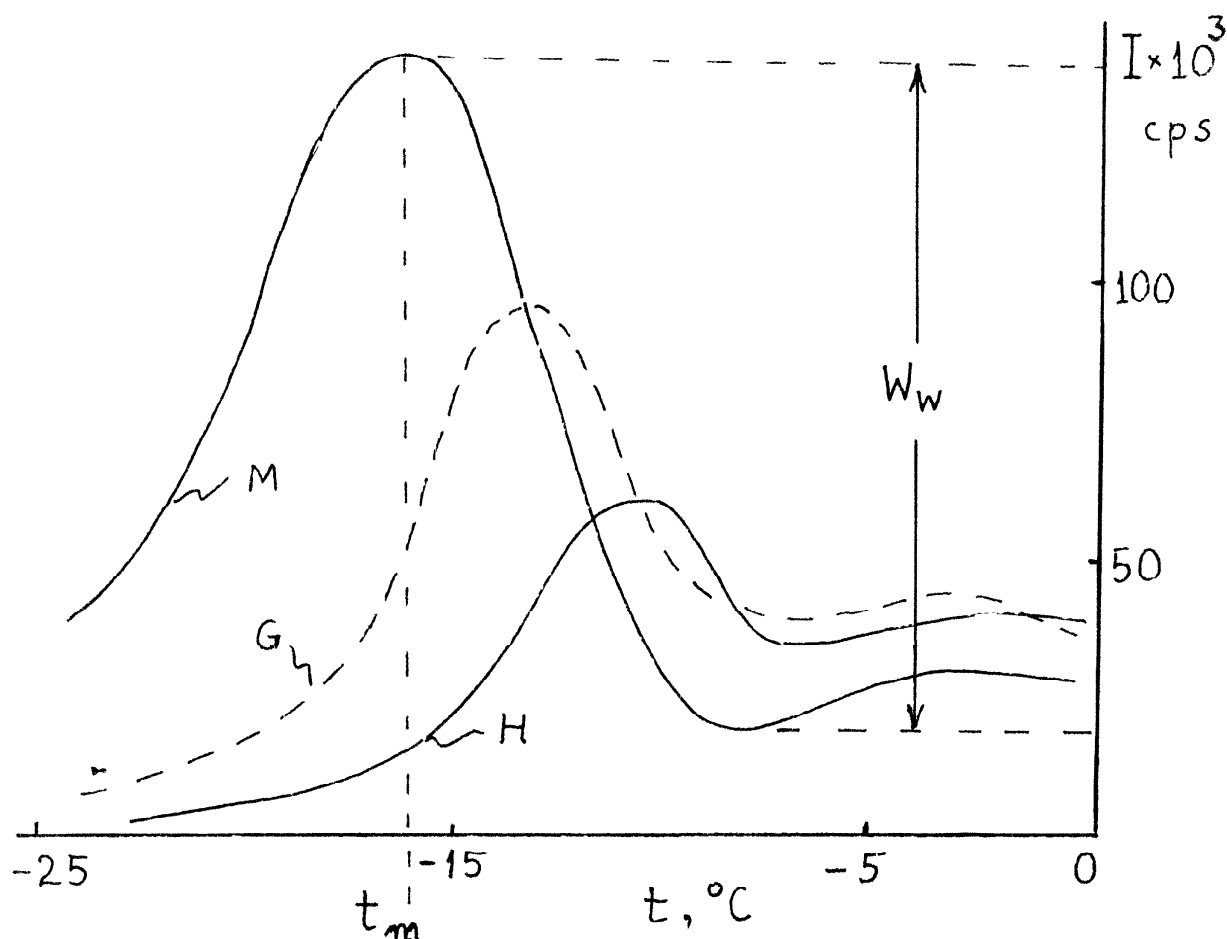


Rys. 5. Krzywe „histerezy temperaturowej” spontanicznej ultrasonowej luminescencji kiełków jęczmienia dla dwóch różnych cykli temperaturowych, przy stałej szybkości zmian temperatury $\dot{T} = 0,5 \text{ K} \cdot \text{min}^{-1}$. Strzałkami oznaczono kierunek zmian T [28,29]

funkcji malejącej temperatury dla próbek liści zielonych różnych gatunków i odmian roślin uprawnych, dają charakterystyczne krzywe, pokazane na rys. 6 [3]. Wyznaczone z tych krzywych parametry t_m i W_w są dobrze skorelowane ze zdolnością danej rośliny do hartowania się w niskich temperaturach, a więc jej mrozoodpornością. Szerokie zastosowanie może znaleźć opóźniona luminescencja w rolnictwie i ochronie środowiska, gdyż wiele herbicydów i toksycznych emisji przemysłowych, np. SO_2 , silnie wpływa na aparat fotosyntetyczny, a przez to na kinetykę zaniku milisekundowej i sekundowej tej luminescencji. Zagadnienia te są badane w Zakładzie Fizyki Akademii Rolniczej w Szczecinie [14].

Wymienione przykłady stanowią jedynie pobieżną ilustrację potencjału aplikacyjnego metod spontanicznej i fotoindukowanej luminescencji, szerzej omówionych w [27]. Należy podkreślić niein-

wazyjny charakter tych metod, wykorzystujących powszechne zjawisko spontanicznej lub fotoindukowanej emisji obiektów biologicz-



Rys. 6. Krzywe temperaturowe opóźnionej luminescencji fotosyntetycznej z liści odmian pszenicy o różnej mrozoodporności: M - odporna, G - średnio odporna, H - mało odporna [3]

nych *in vivo*. Metodyka i technika tych pomiarów sprawia jednak szereg trudności, a same pomiary są stosunkowo niedokładne i mało powtarzalne. Wynika to przede wszystkim ze zmienności obiektów biologicznych i ich wielkiej wrażliwości na subtelne zmiany warunków. Jeszcze większe trudności powstają podczas interpretacji tak złożonych procesów i struktur co sprawia, że mechanizmy molekularne i supramolekularne, leżące u podstaw zjawiska emisji fotonowych i ich związków z procesami i biostrukturami, są wciąż dalekie od dostatecznego poznania.

Generalna konkluzja wynikająca z powyższego przeglądu wybranych zagadnień prowadzi do wniosku, że ultrasłabe emisje fotonowe

mogą służyć nie tylko jako metody badania procesów i struktur biologicznych, lecz także stanowią obfite źródło fundamentalnych problemów biofizycznych.

Maszynopis wpłynął do Redakcji 26 VI 1985

LITERATURA

- [1] Adam W., Cilentto G., "Chemical and Biological Generation of Excited States", Academic Press, New York 1982.
- [2] Allen R. C., Liberman M. M., *Infect. Immun.*, **45**, 475-482 (1984).
- [3] Brzóstowicz A., Prokowski Z., Murkowski A., Grabikowski E., *Acta Agrobot.*, **1**, **38**, 116-122 (1985).
- [4] Byh A. I., Vasiliev R. F., Rożicki N. N., *Itogi Nauki i Tech.*, ser. Radiac. Chim., t. 2, AN SSSR, Moskwa 1979.
- [5] Cadenas E., *Photochem. Photobiol.*, **40**, 823-830 (1984).
- [6] Cadenas E., Sies H., Campa A., Cilentto G., *Photochem. Photobiol.*, **40**, 661-666 (1984).
- [7] Callahan P. S., *Proc. Intern. Conf. Lasers'78*, 99-102; *Physiol. Chem. Phys.*, **12**, 31-38 (1980).
- [8] Chwirut W. B., Dygdała R. S., Chwirut S., *Cytobios*, **39** (1985).
- [9] Fröhlich H., [w:] "Coherent Excitations in Biological Systems", Fröhlich H., Kremer F., eds., Springer Verlag, Berlin-Heidelberg 1983.
- [10] Inaba H., Yamagishi A., Takyu C., Yoda B., Goto Y., Miyazawa T., Kaneda T., Sasaki T., *Opt. Las. Engng.*, **2**, 125-130 (1982).
- [11] Khan A. U., *J. Am. Chem. Soc.*, **105**, 7195-7197 (1983); *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **122**, 668-675 (1984).
- [12] Li K. H., *Laser Electro-Optik*, **3**, 32-33 (1981).
- [13] Li K. H., Popp F. A., *Phys. Lett.*, **93** A., 262-266 (1983); [w:] "Coherent Excitations in Biological Systems", Fröhlich H., Kremer F., eds., Springer Verlag, Berlin-Heidelberg 1983.
- [14] Murkowski A., *Post. Nauk Roln.*, **4**, 3-16 (1974); *Zesz. Nauk. Uniw. Jagiel. CCCXCIV, Prac. Biol. Mol.*, **2**, 31-36 (1975).
- [15] Nagl W., Popp F. A., *Cytobios*, **37**, 45-62; 71-83 (1983).
- [16] Nikokavouras J., Vassilopoulos G., *Z. phys. Chem. Leipzig*, **264**, 1217-1219 (1983).
- [17] Polewski K., Pukacki W., Sławińska D., Sławiński J., "Biofizyka - Prace Doświadczalne", Tyrawska-Spychałowa D., Wilczok T., wyd., WSPR, Siedlce 1980.
- [18] Popp F. A., Bahr W., Böhm J., Grass P., Grölig G., Tattmeyer M., Schmidt H. G., Wulle P., *Collect. Phenomena*, **3**, 187-214 (1981).
- [19] Popp F. A., "Biologie des Lichtes", Paul Parey Verlag, Berlin 1984.
- [20] Popp F. A., Nagl W., Li K. H., Scholz W., Weingärtner O., Wolf R., *Cell Viophys.*, **6**, 33-52 (1984).

- [21] Popp F. A., Sławiński J., Li K. H., Nagl W., Weigärtner O., w przygotowaniu do druku.
- [22] Ratemeyer M., Popp F. A., Nagl W., *Naturwissenschaften*, **68**, 572-3 (1981).
- [23] Schamhart D., Sławiński A., Van Wijk R., *Cancer Research* (w druku).
- [24] Sharov U. S., Suslova T. B., Deyev A. I., Vladimirov Yu. A., *Biofizika*, **25**, 943-945 (1980).
- [25] Sławińska D., Sławiński J., *Post. Fiz. Med.*, **16**, 101-116 (1981); *Physiol. Chem. Phys.*, **14**, 363-374 (1982).
- [26] Sławińska D., Sławiński J., *Photochem. Photobiol.*, **37**, 709-715 (1983).
- [27] Sławińska D., Sławiński J., [w:] „Chemiluminescence”, Burr J., ed., Marcel Dekker, New York 1985.
- [28] Sławiński J., Milczarek I., Grabikowski E., *Zesz. Nauk. WSR w Szczecinie*, **39**, 249 (1973); **42**, 307 (1974); **48**, 97 (1974).
- [29] Sławiński J., Majchrowich I., Grabikowski E., *Acta Mycol.*, **17**, 127-135 (1981); *Bio-Phys.*, **1**, 72-100 (1980).
- [30] Sławiński J., Grabikowski E., Cieśla L., *J. Luminescence*, **24/25**, 791-795 (1981).
- [31] Sławiński J., *Zagad. Biof. Współ.*, **5**, 5-38 (1980); *Post. Fiz. Med.*, **17**, 59-68 (1982); *Zesz. Problem. Post. Nauk Roln.*, **271**, 85-104 (1984).
- [32] Williams M., Leigh J. S., Chance B., *Ann. New York Acad. Sci.*, 386-389 (1982).
- [33] Żuravlev A. I., [w:] „Biochemiluminescencijskaja”, Tr. MOIP, Moskwa, Nauka, **58**, 3-276 (1983).

Janusz Sławiński

PHOTON EMISSIONS IN THE RESEARCH OF BIOLOGICAL SYSTEMS

Summary

The article reviews main conceptual and methodological problems in the research of ultraweak photon emission from biological objects. A short basic considerations on energetics, spectroscopy, properties of photon emissions and methods of measurements are given. Three selected problems are discussed: 1) the determination of the coherence degree of an endogeneous weak radiation and adequate methods - the photoncount statistics and the analysis of the kinetics of photo-induced luminescence, 2) modification of the primary endogeneous radiation by secondary processes inside the biological medium, and 3) possibility of the generation of electronically excited states in molecular interactions occurring within a biological medium. Selected examples illustrate applications of low-intensity luminescence in the spectroscopy of singlet molecular oxygen, excited triplet carbonyls and as a diagnostic method in the evaluation of properties of biological samples in medicine, agriculture and protection of environment.

Prof. dr hab. JANUSZ SŁAWIŃSKI
Samodzielny Zakład Fizyki
Wyższej Szkoły Pedagogicznej w Krakowie
ul. Podchorążych 2
30-084 Kraków