

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования  
«Сибирский государственный медицинский университет»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Л.В. Смаглий, С.В. Гусакова,  
И.В. Петрова, И.В. Ковалев, Ю.Г. Бирулина,  
В.С. Рыдченко, А.В. Носарев**

**Руководство  
к практическим занятиям  
по общей биофизике: хемилюминометрия**

Учебное пособие

ТОМСК  
Издательство СибГМУ  
2019

УДК 577.3 :535. 379] (075.8)

ББК 52. 57я73

Р 851

**Авторы:**

Л.В. Смаглий, С.В. Гусакова, И.В. Петрова,  
И.В. Ковалев, Ю.Г. Бирулина, В.С. Рыдченко, А.В. Носарев

**Руководство к практическим занятиям по общей биофизике:**

Р 851 **хемилюминометрия:** учебное пособие / Л.В. Смаглий, С.В. Гусакова, И.В. Петрова, И.В. Ковалев, Ю.Г. Бирулина, В.С. Рыдченко, А.В. Носарев – Томск: СибГМУ, 2019. – 57 с.

Данное пособие включает описание практических работ, направленных на освоение навыков работы с хемилюминометром и проведения хемилюминисцентного анализа. Может быть использовано при проведении практических занятий по дисциплинам «Квантовая биофизика» и «Общая биофизика». В описание практических занятий вошли теоретические основы используемых методов, практические подходы для выполнения работы, методы расчета исследуемых параметров, образцы таблиц, графиков, гистограмм, которые обучающиеся должны построить по полученным результатам, а также вопросы для самоподготовки к занятиям, контрольные вопросы, тестовые задания и ситуационные задачи.

Учебно-практическое пособие подготовлено в соответствии с Федеральным Государственным образовательным стандартом высшего профессионального образования для студентов, обучающихся по основным профессиональным образовательным программам высшего образования – программам специалитета по специальностям: 30.05.02 – Медицинская биофизика, 30.05.01 – Медицинская биохимия, 30.05.03 – Медицинская кибернетика.

**УДК 577.3 :535. 379] (075.8)**

**ББК 52. 57я73**

**Рецензент:**

**Т.В. Ласукова** – доктор биологических наук, доцент, и.о. заведующего кафедрой медико-биологических дисциплин ФГБОУ ВО ТГПУ.

*Утверждено и рекомендовано к печати Учебно-методической комиссией медико-биологического факультета ФГБОУ ВО СибГМУ (протокол № 4 от 26 сентября 2018 г.).*

© Издательство СибГМУ, 2019

© Смаглий Л.В., Гусакова С.В., Петрова И.В.,  
Ковалев И.В., Бирулина Ю.Г., Рыдченко В.С., Носарев А.В., 2019

## **ВВЕДЕНИЕ**

Хемилюминесценция характерна как для растительных, так и для животных клеток, и в основном обусловлена окислением органических соединений активными формами кислорода. Биохемилюминесценция протекает также с участием специальных ферментов – люцифераз, катализирующих реакции окисления субстрата люциферина, сопровождающиеся эмиссией фотонов.

Методы хемилюминесцентного анализа используются при изучении молекулярных основ физиологических процессов, исследовании закономерностей и механизмов развития патологических состояний, оценке защитно-приспособительных возможностей организма при промышленно-производственных, медикаментозных, экологических воздействиях, оценке эффективности лекарственных препаратов. Хемилюминесцентный анализ используют для измерения содержания АТФ, и АТФ-азы, креатинкиназы, аденилатциклазы, фосфодиэстеразы, миелопероксидазы, протеолитических ферментов, ферментов монооксигеназной системы печени и др. Особое значение данный вид анализа имеет для исследования процессов свободно-радикального окисления. В связи с этим метод эффективен для оценки функционального состояния фагоцитов периферической крови (гранулоцитов и моноцитов), его используют для прогнозирования тяжести заболевания и контроля эффективности терапии при воспалительных процессах.

Данное учебно-практическое пособие предназначено для изучения принципов работы с хемилюминометром и методов хемилюминесцентного анализа студентами, обучающимися по основным профессиональным образовательным программам высшего образования – программам специалитета по специальностям: 30.05.02 – Медицинская биофизика, 30.05.01 – Медицинская биохимия, 30.05.03 – Медицинская кибернетика.

## СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	3
ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ ИЗМЕРЕНИЯ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ.....	5
<b>ЗАНЯТИЕ 1. ИЗМЕРЕНИЕ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ ТКАНЕЙ РАСТЕНИЙ .....</b>	<b>17</b>
<b>ЗАНЯТИЕ 2. ИЗМЕРЕНИЕ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ ЛИПОПРОТЕИДОВ, ИНДУЦИРОВАННОЙ ИОНАМИ Fe<sup>2+</sup> .....</b>	<b>26</b>
<b>ЗАНЯТИЕ 3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОДУКЦИИ ПЕРЕКИСИ ВОДОРОДА В КЛЕТКАХ МЕТОДОМ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО АНАЛИЗА.....</b>	<b>37</b>
<b>ЗАНЯТИЕ 4. ПРОВЕДЕНИЕ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО АНАЛИЗА ЦЕЛЬНОЙ РАЗВЕДЕННОЙ КРОВИ.....</b>	<b>46</b>
ЭТАЛОНЫ ОТВЕТОВ К ТЕСТОВЫМ ЗАДАНИЯМ .....	52
ОТВЕТЫ К СИТУАЦИОННЫМ ЗАДАЧАМ.....	53
РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА .....	56

## ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ ИЗМЕРЕНИЯ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ

**Люминесценция** (от латинского *lumen* – свет и *-escent* – суффикс, означающий слабое действие) – свечение вещества, представляющее собой избыточное излучение по сравнению с тепловым излучением тела, продолжающееся в течение времени, значительно превышающего период световых колебаний. Длительность люминесценции – от  $10^{-10}$  до нескольких часов.

**Хемилюминесценция – свечение**, возникающее при возбуждении молекул в процессе химических реакций.

В реакции хемилюминесценции выделяют три стадии:

1. Восстановление одного из участников реакции (присоединение электрона) и окисление второго (отрыв электрона). Это приводит к запасанию химической энергии в системе, которая позднее выделится в виде фотона.
2. Перенос электрона (окислительно-восстановительная реакция) на более высокий энергетический уровень и образование продукта реакции в электронно-возбужденном состоянии.
3. Высвечивание фотона при переходе молекулы из электронно-возбужденного в основное состояние (люминесценция).

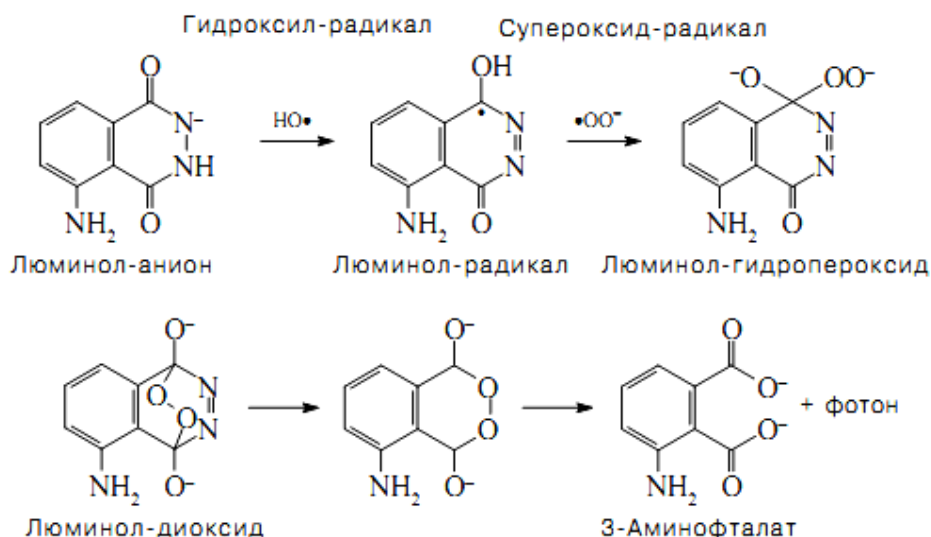
Для изучения хемилюминесценции используют химические и физические активаторы хемилюминесценции.

1. Химические активаторы хемилюминесценции – это соединения, вступающие в химические реакции с активными формами кислорода (АФК) или органическими свободными радикалами с образованием молекул, находящихся в возбужденном электронном состоянии. При их переходе в основное состояние происходит высвечивание фотонов:



R – радикал, A – химический активатор, RA\* – продукт превращения молекулы активатора в возбужденном электронном состоянии, RA – продукт превращения молекулы активатора в основном электронном состоянии.

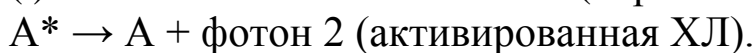
Примерами химических активаторов хемилюминесценции являются люминол (3-аминофталевый гидразид) (рис. 1) и люцигенин-бис (N-метилакридиний). Люминол под действием окислителя (например, радикала гидроксила) образует радикал люминола, который затем вступает в реакцию с супероксидным радикалом, образуя внутреннюю перекись (диоксид). Ее разложение приводит к образованию возбужденной молекулы 3-аминофталата. Переход этой молекулы в основное состояние сопровождается испусканием кванта света.



**Рис. 1.** Химические превращения люминола под действием радикалов гидроксила и супероксида

В результате реакций образуется 3-аминофталат, находящийся в электронно-возбужденном состоянии, который переходит в основное состояние с испусканием кванта света.

2. Физические активаторы не вступают в химические реакции и не влияют на ход реакций, сопровождающихся свечением, однако многократно усиливают интенсивность хемилюминесценции. В основе действия физических активаторов лежит миграция энергии с молекулы продукта хемилюминесцентной реакции на активатор



К физическим активаторам относятся люминесцирующие соединения, которые используются для усиления ХЛ при цепном окислении липидов. Так, производное кумарина усиливает хемилюминесценцию, сопровождающую цепное окисление липидов, более чем в

1500 раз, не влияя при этом на ХЛ при взаимодействии радикалов кислорода (гидроксила и супероксида).

### **Факторы, влияющие на интенсивность хемилюминисценции**

Интенсивность свечения при реакциях хемилюминисценции ( $I_{\text{ХЛ}}$ ) зависит от:

- 1) скорости химической реакции, которая сопровождается свечением ( $v_{\text{ХЛ}}$ );
- 2) вероятности образования молекулы продукта в электронно-возбужденном состоянии (квантовым выходом возбуждения,  $\eta_{\text{exc}}$ );
- 3) вероятности высвечивания фотона при переходе возбужденной молекулы продукта в основное состояние (квантовый выход люминисценции,  $\eta_{\text{lum}}$ ).

Интенсивность свечения при реакциях хемилюминисценции ( $I_{\text{ХЛ}}$ ) определяется по формуле:

$$I_{\text{ХЛ}} = v_{\text{ХЛ}} \times \eta_{\text{exc}} \times \eta_{\text{lum}}$$

В случае химических активаторов хемилюминисценции все три сомножителя в уравнении велики, поэтому свечение имеет высокую интенсивность. Физические активаторы хемилюминисценции увеличивают интенсивность люминисценции за счет физического процесса переноса энергии на молекулу активатора, которая обладает высоким квантовым выходом люминисценции.

### **Эмпирические законы хемилюминисценции и их физический смысл**

Для многих реакций, сопровождающихся низкоинтенсивной люминисценцией, справедливы следующие правила:

1. Спектр хемилюминисценции в большей степени является аналогом спектра фосфоресценции, а не спектра флуоресценции.
2. Абсолютная величина квантового выхода в хемилюминисцентных реакциях обычно очень мала.
3. Энергия испущенного фотона близка сумме энтальпии реакции и энергии активации (правило Одюбера).

### **Области применения хемилюминисцентных методов**

Хемилюминисцентные методы используются для регистрации сверхслабых световых потоков, возникающих при химических и биохимических реакциях, при физических и биологических процессах, сопровождающихся образованием свободных радикалов. Они не тре-

буют особых лабораторных условий и специальной подготовки материала к анализу, чувствительны, надежны, отвечают требованиям, предъявляемым к экспресс-способам исследования. Применение хемилюминесцентных методов исследования позволяет успешно решать многие теоретические и практические медико-биологические задачи.

Таблица 1

*Области применения хемилюминесцентных методов*

Область	Применение
<b>Теоретические дисциплины:</b>	
Физиология, патофизиология, биофизика, молекулярная биология и др.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Изучение молекулярных основ физиологических процессов, исследование общих закономерностей и механизмов развития патологических состояний.</li> <li>• Оценка защитно-приспособительных возможностей организма при различных воздействиях: промышленно-производственных, медикаментозных, экологических.</li> <li>• Совершенствование и целенаправленный поиск эффективных способов диагностики, профилактики и лечения.</li> </ul>
Фармакология	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Скрининг биологически активных соединений.</li> <li>• Подбор препаратов, влияющих на свободно-радикальное окисление.</li> <li>• Прогнозирование эффективности действия антиоксидантов.</li> </ul>
Биохимия	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Определение микроколичеств АТФ, НАДН и др.</li> </ul>
Экология	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Раннее выявление негативного действия факторов среды.</li> <li>• Оценка степени патогенности внешних воздействий.</li> <li>• Биоэкологический мониторинг.</li> </ul>
<b>Прикладные дисциплины:</b>	
Лабораторно-диагностическая служба	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Диспансеризация, диагностика скрытой патологии, состояния предболезни.</li> <li>• Раннее выявление нарушений защитно-приспособительных реакций организма.</li> <li>• Оценка активности патологического процесса.</li> </ul>
Медицина катастроф, токсикология	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Оценка тяжести состояния при экстремальных воздействиях (травмы, ожоги, радиация и т. д.).</li> <li>• Выявление токсемии, контроль лечения, контроль эффективности гемодиализа, гемосорбции, плазмофереза и т. д.</li> </ul>



Хирургия, анестезиология, реаниматология	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Оценка тяжести состояния больных.</li> <li>• Выявление перехода инфильтративной стадии воспаления в некроз.</li> <li>• Изучение молекулярных механизмов действия анестетиков.</li> <li>• Выбор адекватной анестезии с учетом состояния свободно-радикального окисления.</li> </ul>
Акушерство, гинекология	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Наблюдение за беременными, контроль развития плода.</li> <li>• Ранняя диагностика токсикозов, прогнозирование исхода родов.</li> </ul>
Неонатология, педиатрия	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Выявление внутриутробной инфицированности, наблюдение за развитием новорожденного.</li> <li>• Диспансеризация детей.</li> </ul>
Стоматология	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Определение цитотоксических свойств слюны.</li> </ul>
Кардиология	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Типирование и выявление гиперлиппротеидемии, предрасположенности к сердечно-сосудистым заболеваниям.</li> <li>• Раннее распознавание атеросклероза, инфаркта миокарда.</li> <li>• Изучение механизмов действия антисклеротических препаратов, антигипоксантов.</li> </ul>
Иммунология, аллергология	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Оценка иммунного статуса, диагностика иммунопатий, иммунодефицитных состояний.</li> <li>• Выявление аллергенов.</li> </ul>
Трансплантология	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Определения жизнеспособности трансплантантов.</li> <li>• Ранняя диагностика криза отторжения.</li> </ul>
Инфекционные заболевания	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Диагностика, дифференциальная диагностика инфекционных заболеваний.</li> <li>• Оценка активности процесса.</li> <li>• Определение содержания антител к антигену в сыворотке.</li> </ul>
Системные заболевания	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Уточнение патогенеза, подбор эффективных антиревматических средств.</li> </ul>
Онкология	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Диагностика, дифференциальная диагностика опухолевых процессов, контроль лечения.</li> </ul>
Пульмонология	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Диагностика, определение характера воспалительного процесса, выбор оптимальной тактики лечения.</li> </ul>
Нефрология	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Экспресс-оценка функционального состояния почек.</li> <li>• Контроль гемодиализа.</li> </ul>
Судебная медицина	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Определение давности смерти.</li> <li>• Выявление приема наркотиков, токсических средств.</li> </ul>

Офтальмология	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Изучение механизмов развития гемофтальма, увеита, дегенерации сетчатки, катаракты.</li> </ul>
Неврология	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Уточнение патогенеза рассеянного склероза, дистрофической психопатии.</li> </ul>
Гематология	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Оценка функционального состояния и активности клеток крови и антиокислительных свойств.</li> </ul>
Эндокринология	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Изучение механизмов развития сахарного диабета, гипертиреоза, гипотиреоза и других эндокринных нарушений.</li> </ul>
Гепатология	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Оценка функционального состояния печени.</li> </ul>
Геронтология	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Изучение возрастных изменений процессов окисления.</li> </ul>
Фармакология и косметология	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Оценка влияния фармакологических препаратов и косметологических средств на процессы старения организма (оценка антиоксидантной активности веществ).</li> </ul>
Курортология	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Определение показаний, противопоказаний и контроль эффективности санаторно-курортного лечения.</li> </ul>
Физиотерапия	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Показания, противопоказания и контроль состояния при физиотерапевтических воздействиях (гипербарическая оксигенация, лазеротерапия, иглоукалывание и т. п.).</li> </ul>
Физкультура и спорт	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Мониторинг состояния спортсменов, оценка адекватности физических нагрузок, рациональное построение тренировочного процесса.</li> </ul>
Диетология	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Определение пищевой ценности и сохранности продуктов.</li> <li>• Поиск пищевых стабилизаторов.</li> </ul>

**Хемилюминометр Lum-1200** – полуавтоматический аппаратно-программный комплекс, предназначенный для регистрации и анализа сверхслабых световых потоков, сопровождающих химические и биологические процессы (хемилюминесценция, биолюминесценция). Основные функциональные блоки хемилюминометра включают кюветное отделение, термостат, фотоэлектронный умножитель (ФЭУ) и блок управления (рис. 2).

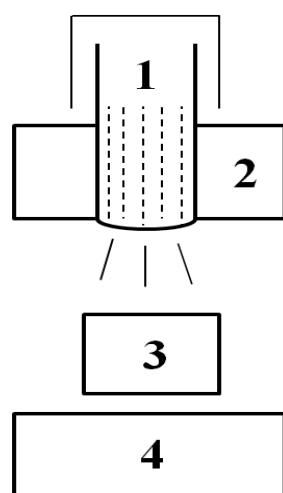
1. Кюветное отделение предназначено для размещения кювет с исследуемыми образцами. Оно представлено вращающимся барабаном с 12 гнездами для размещения кювет. Прибор осуществляет последовательные циклические измерения интенсивности свечения в каждой кювете путем вращения барабана. Открытие кюветного отделения осуществляется поворотом крышки против часовой стрелки на угол

90° и последующим ее подъемом. Закрытие кюветного отделения осуществляется в обратном порядке. В качестве измерительных кювет могут быть использованы любые стеклянные, полистироловые или полипропиленовые пробирки.

2. Термостат осуществляет поддержание постоянной температуры исследуемого образца в диапазоне от 30 до 50 °С. Для стабильности поддержания температуры рекомендуется перед началом работы прогреть прибор с включенным термостатом в течение 20 минут.

3. ФЭУ осуществляет измерение интенсивности свечения исследуемого образца путем преобразования квантов падающего света в отдельные токовые импульсы. ФЭУ располагается под кюветным отделением, поэтому измерение интенсивности свечения осуществляется со стороны дна кюветы. ФЭУ обладает высокой чувствительностью и предназначен для работы только со слабыми и сверхслабыми световыми потоками, позволяя определить люминесценцию интенсивностью до 100 фотонов/с в диапазоне длин волн 300–700 нм и при максимально возможной частоте измерений (1 образец) 1 Гц. Для защиты ФЭУ от засветки интенсивным светом в приборе имеется система аварийного отключения ФЭУ.

4. Блок управления осуществляет управление всеми компонентами прибора и передачу результатов измерений в компьютер. Регистрация сигнала и последующий анализ полученных данных проводится с помощью программного обеспечения PowerGraph.



**Рис. 2.** Основные функциональные блоки хемилюминометра Lum-1200:  
1 – кюветное отделение, 2 – термостат, 3 – фотоэлектронный умножитель,  
4 – блок управления

### **Назначение хемилюминометра Lum-1200:**

1. Изучение процессов свободно-радикального окисления.
2. Определение степени окисленности биологического материала, продуктов питания и других субстратов.
3. Оценка состояния прооксидантных и антиоксидантных систем человека и животных.
4. Определение антиоксидантной активности фармакологических препаратов, биологических жидкостей, косметологических средств и пищевых добавок.
5. Изучение функциональной активности клеток крови.
6. Контроль микробиологической чистоты различных объектов (продуктов питания, воды, воздуха, технологических поверхностей, помещений).
7. Контроль токсичности проб воды, воздушной среды, почвы, а также различных соединений и материалов.

### **Порядок работы с хемилюминометром Lum-1200 и программой PowerGraph:**

1. Ознакомиться с руководством по эксплуатации в хемилюминометру Lum-1200 и руководством пользователя к программному обеспечению PowerGraph.
2. Проверить, закрыта ли крышка кюветного отделения.
3. Подключить блок питания прибора к сети 220 Вольт, при этом на приборе должен загореться зеленый индикатор «Power».
4. Включить персональный компьютер, запустить программу «PowerGraph». В открывшемся диалоговом окне выбрать устройство, используемое для регистрации данных (Lum-1200).
5. Установить настройки прибора (Сервис→Настройки Lum-1200):

#### **а) выбор режима измерений**

Хемилюминометр Lum-1200 позволяет использовать режим абсолютных или относительных измерений.

**Относительные измерения** – измерения светового потока (фотон/секунду). В этом режиме подсчитывается количество импульсов, поступающих от ФЭУ за 1 секунду, измеряемая величина не зависит от частоты регистрации.

**Абсолютные измерения** – измерение общего количества импульсов, поступающих от ФЭУ. Время накопления импульсов соответствует обратной величине частоты регистрации, поэтому измеряемое значение зависит от частоты регистрации.

### ***б) диапазон и чувствительность измерений***

Диапазон измерений определяет максимальное регистрируемое значение, а чувствительность – разрешающую способность измерений. Хемилюминометр Lum-1200 позволяет использовать диапазон измерений от 10 000 ( $\pm 1$ ) (диапазон до 10000 импульсов с чувствительностью 1 импульс) до 10 000 000 ( $\pm 1000$ ) (диапазон до 10 000 000 импульсов с чувствительностью 1000 импульсов). Выбор диапазона измерений зависит от интенсивности измеряемого светового потока.

### ***в) управление термостатом***

Включение и выключение термостата осуществляется переключателем.

«Нагрев». Установка температуры осуществляется в текстовом поле выбором значений температуры из списка или вводом численного значения с клавиатуры (с точностью до 0.1).

### ***г) контрольный источник света***

Контрольный источник света предназначен для проверки работоспособности ФЭУ. Включение контрольного источника света позволяет исключить аппаратную неисправности в случае отсутствия ожидаемого сигнала от образца. Включение и выключение контрольного источника света осуществляется в группе «Контрольный источник» с помощью переключателей уровня свечения. Измерение интенсивности контрольного источника осуществляется при пустом кюветном отделении! Перед измерением исследуемых образцов контрольный источник света следует выключить!

б. Установить настройки программы PowerGraph:

***а) выбор количества регистрируемых каналов (Сервис→Каналы и графики→Количество графиков).***

Необходимо выбрать от 1 до 14 каналов. При этом нужно помнить, что:

- **каналы 1–12** – интенсивность люминесценции (по этим каналам программа получает от прибора результаты измерения интенсивности свечения образцов)
- **канал 13** – состояние прибора (по этому каналу программа получает от прибора информацию о состоянии кюветного отделения)
- **канал 14** – температура (по этому каналу программа получает от прибора значения температуры в кюветном отделении в °С .

***б) установка частоты измерений (Сервис→Частота регистрации)***

Установить частоту регистрации 1 Гц (если используется 1 гнездо кюветы). Если количество одновременно измеряемых образцов  $>1$ , то во вкладке «Медленные» установить частоту регистрации равную  $1/N$ , где  $N$  – количество одновременно измеряемых образцов.

*в) выбор параметров синхронизации* используется для автоматического управления запуском и остановкой регистрации данных. При этом программа непрерывно получает данные от прибора, но сохраняет только участок, соответствующий заданным условиям.

7. Запуск программы измерения интенсивности свечения осуществляется нажатием кнопки «Старт» в правой нижней части главного окна программы. Полученные данные регистрируются в отдельный блок данных в виде непрерывной временной последовательности измеренных значений. Остановка измерения осуществляется нажатием кнопки «Стоп».

#### 8. Провести анализ полученных данных (Анализ→Таблица значений).

Общий алгоритм проведения анализа данных:

- а) в списке блоков выбрать анализируемый блок данных или первый элемент **Весь файл** для анализа нескольких блоков;
- б) в списках **Категория** и **Функция** выбрать одну или несколько математических функций;
- в) в списке **Источник** данных выбрать канал, содержащий анализируемые данные интенсивности свечения;
- г) в меню **Функции** вызвать команду **Вычислить (F5)** для вычисления одной выбранной функции или команду **Вычислить все (Ctrl+F5)** для проведения вычислений по нескольким выбранным функциям;
- д) сохранить результаты анализа в текстовый файл или скопировать в буфер с помощью команд **Файл→Сохранить** или **Правка→Копировать**.

Программа PowerGraph позволяет рассчитать следующие параметры хемилюминесценции и соответствующие им математические функции:

1. **Светосумма** – характеризует общее количество фотонов, попавших на ФЭУ в течение всего времени измерения. Рассчитывается как интеграл (Integral) графика хемилюминесценции.

2. **Наклон** – характеризует среднюю скорость изменения интенсивности свечения (скорости образования фотонов). Рассчитывается как средний дифференциал (Average Slope) графика хемилюминесценции.
3. **Средняя интенсивность** – характеризует средний уровень свечения. Рассчитывается как среднее арифметическое значение (Mean).
4. **Уровень шума** – характеризует интенсивность случайной составляющей свечения. Рассчитывается как стандартное отклонение (Std Deviation).
5. **Максимальная интенсивность** – максимальное значение (Maximum) интенсивности свечения в течение всего времени измерения.
6. **Минимальная интенсивность** – минимальное значение (Minimum) интенсивности свечения в течение всего времени измерения.
7. **Время максимума** – значение времени, соответствующее максимальному значению интенсивности свечения (X at Maximum).
8. **Время минимума** – значение времени, соответствующее минимальному значению интенсивности свечения (X at Minimum).

### **Порядок проведения измерений хемилюминесценции**

1. Установить кювету с исследуемым образцом в кюветное отделение.
2. Закрыть крышку кюветного отделения.
3. Начать регистрацию сигнала фотоэлектронного умножителя.
4. Регистрировать сигнал на протяжении 2–3 минут.
5. Не прерывая регистрации, инициировать свечение исследуемого объекта, введя в образец стеклянной пипеткой раствор, инициирующий свечение.
6. Регистрировать кинетику изменения интенсивности хемилюминесценции образца не менее 15 минут с момента введения раствора.

### **Регистрация кинетики хемилюминесценции**

Исследование кинетики хемилюминесценции даёт представление о динамике химических процессов, вызывающих эффект хемилюминесценции. Регистрация кинетики хемилюминесценции проводится путем регистрации значений интенсивности хемилюминесценции с дальнейшим построением графиков. При регистрации кинетики хемилюминесценции важно правильно выбрать время счёта импульсов: оно обычно меньше, чем при обычном измерении хемилюминесценции, когда время счёта импульсов составляет 30–100 секунд. Для относительно медленных процессов используют время счёта импульсов 5–10 секунд, для более быстрых – 1–5 секунд. При уменьшении вре-

мени счёта импульсов увеличивается разрешение графика по шкале времени, но в то же время увеличивается «шум» (флуктуации зарегистрированных значений) и уменьшается статистическая точность каждого отдельного измерения.



# ЗАНЯТИЕ 1

## ИЗМЕРЕНИЕ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ ТКАНЕЙ РАСТЕНИЙ

**Цель занятия:** зарегистрировать хемилюминесценцию непигментированных частей растения

**Материалы и оборудование:**

**Задание 1:** хемилюминометр; шприц 10 мл; фосфатный буфер (рН 6,86), разбавленный дистиллированной водой 1:10; КСl 0,5 М, приготовленный из 1 М КСl разбавлением буферным раствором 1:1; люминол  $10^{-4}$ .

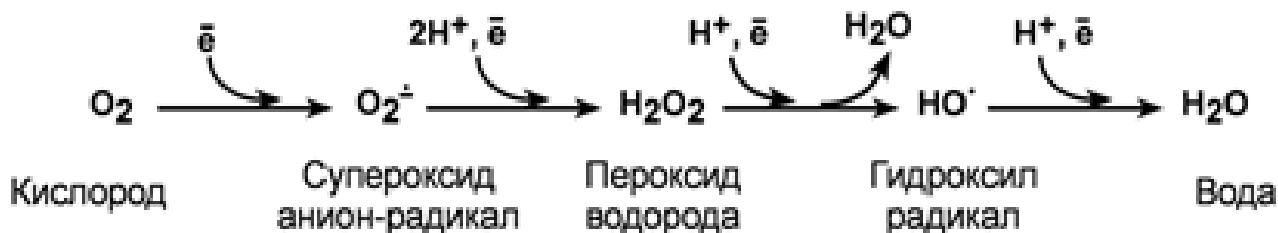
**Задание 2:** хемилюминометр; шприц 10 мл; люминол, 1н НСl, Трис, дистиллированная вода, физиологический раствор.

**Вопросы для самоподготовки:**

1. Люминесценция, ее виды.
2. Характеристики хемилюминесценции.
3. Хемилюминесценция в биологических объектах.

## ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

**Образование активных форм кислорода в биологических системах.** В биологических системах основным источником слабой спонтанной люминесценции выступают активные формы кислорода (АФК). АФК – это свободно-радикальные молекулы, которые обладают высокой химической активностью и участвуют во многих биологических процессах. АФК образуются путем ступенчатого восстановления молекулярного кислорода до воды (рис. 3).



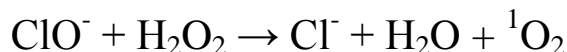
*Рис. 3.* Общая схема процесса восстановления кислорода до воды

Клетки аэробных организмов имеют ферментную систему, дисмутирующую супероксидные анион-радикалы:

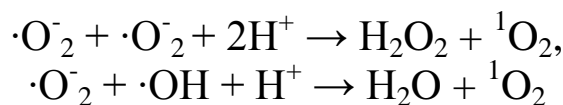


Еще одним представителем АФК является синглетный кислород ( $^1O_2$ ). Синглетный кислород – возбужденная форма молекулярного кислорода, которая образуется в следующих реакциях:

1) реакция между гипохлоритом и перекисью водорода:



2) реакция взаимодействия кислородных радикалов:

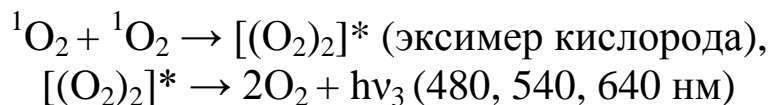


Синглетный кислород обладает наибольшей реакционной способностью среди АФК. Реакции, протекающие с образованием или участием синглетного кислорода, обуславливают хемилюминесценцию:

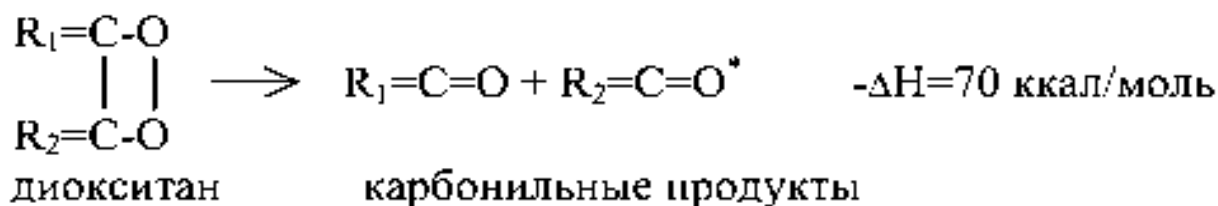
1) при переходе синглетного кислорода в основное (триплетное) состояние происходит испускание кванта света (хемилюминесценция) в инфракрасной области спектра (длина волны 1270 нм):



2) молекулы синглетного кислорода образуют возбужденные димеры кислорода, которые переходят в основное состояние с испусканием квантов света в видимом спектре (длины волн 635, 580, 535 нм):



3) при взаимодействии синглетного кислорода с ненасыщенными соединениями образуются перекисные соединения класса диокситанов, распад которых может завершиться электронным возбуждением одного из карбонильных продуктов реакции:



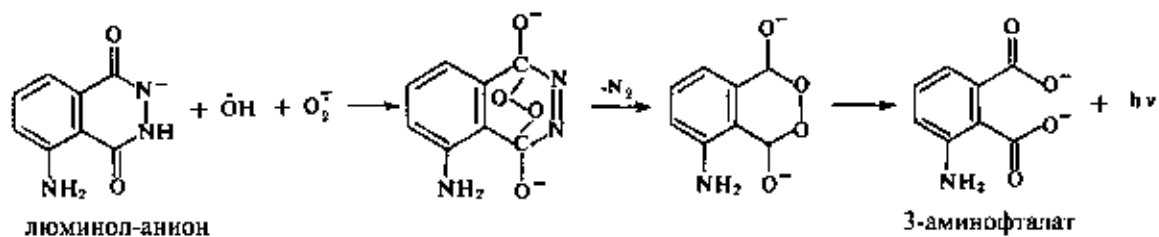
При переходе карбонильного соединения из возбужденного состояния в основное происходит излучение кванта света.

Низкая интенсивность свечения в результате протекания реакций с участием АФК обусловлена следующими причинами:

1. Короткое время жизни синглетного кислорода в водных системах (около 2 микросекунд).
2. Высокая скорость взаимодействия синглетного кислорода с различными ненасыщенными соединениями – тушителями синглетного кислорода. Так, в биологических системах тушителями хемилюминесценции, обусловленной синглетным кислородом, являются каротиноиды и  $\alpha$ -токоферол (витамин Е).
3. Интенсивность излучения димеров кислорода пропорциональна квадрату концентрации синглетного кислорода. Так как концентрация синглетного кислорода очень мала, излучением видимого света за счет димеров кислорода в биологических системах можно пренебречь.

**Особенности образования активных форм кислорода в растительных клетках.** В клетках концентрация АФК в норме поддерживается на очень низком уровне. Стационарная концентрация  $O_2^-$  в растительных клетках составляет  $10^{-9}$  М. Концентрация  $H_2O_2$  находится на уровне  $10^{-6}$  М в связи с высокой активностью каталазы и пероксидаз, разлагающих  $H_2O_2$ .

При некоторых патологических состояниях продукция АФК возрастает. Взаимодействие АФК с ненасыщенными соединениями клетки приводит к образованию перекисных соединений, распад которых может приводить к образованию электронно-возбужденного карбонильного продукта. Рост концентрации АФК в растительных клетках свидетельствует об усилении окислительных процессов, в частности, об окислительном стрессе растений. Учитывая вышеизложенное, для оценки скорости протекания свободнорадикального окисления в биологическом объекте можно использовать хемилюминесцентный метод. Для обнаружения АФК в биологических системах используют хемилюминесцентный индикатор – люминол (гидрозид 3-аминофталиевой кислоты). Люминол вступает в прямое химическое взаимодействие с радикалами  $HO^{\cdot}$  и  $O_2^-$ , образуя 3-аминофталат в возбужденном электронном состоянии, который при переходе в основное состояние излучает квант света:



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

Исследуя кинетику ХЛ, можно судить о влиянии различных факторов среды на физиологическое состояние биологического объекта. Одной из причин, способных спровоцировать окислительный стресс в клетках растений, является их осмотическое повреждение. Усиление генерации АФК в клетках растений при осмотическом повреждении происходит в результате окисления пероксидазами фенольных соединений, выходящих из клеток. Так как АФК оказывают цитотоксическое действие, такой механизм генерации АФК способствует защите растения от внедрения паразитарной микрофлоры, сопровождающегося разрушением клеток.

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

Для непигментированных частей растений (корней гороха, пшеницы, огурцов и др.) время достижения максимума ХЛ зависит от степени обезвоживания, вида и сорта растения. Максимальная интенсивность ХЛ при обезвоживании может превышать стационарный уровень излучения корней до обезвоживания в 3 раза. Такое увеличение интенсивности ХЛ наблюдается 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 и последующему 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.

## ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

### Задание 1

1. Включить хемилюминометр, следуя инструкции.
2. Провести измерение «темнового фона», соответствующего уровню термоэлектронной эмиссии с фотоумножителя.
3. Поместить в кюветное отделение пустую кювету для объекта, закрыть кюветное отделение.
4. Измерить интенсивность свечения пустой кюветы. Если уровень этого свечения превысит 20% от «темнового фона», извлечь кювету и тщательно промыть ее водой.
5. Добившись необходимой чистоты кюветы поместить в нее корни 2–3 растений гороха и установить кювету в барабан кюветного отделения. Ввести в кювету трубочку от шприца для введения растворов. Закрывать крышку камеры. **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 фотоэлектронного умножителя, ввести в кювету шприцем, не открывая камеры 10 мл буферного раствора рН 6,86. Регистрировать ХЛ корней до выхода интенсивности на стационарный уровень, но не более 20 минут.
7. Закрыв шторку фотоэлектронного умножителя, 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 фотоэлектронного умножителя, заменить солевой раствор в кювете на 10 мл буферного раствора и вновь регистрировать кинетику ХЛ 10 минут, после чего добавить 2 мл раствора люминола и зарегистрировать эффект его воздействия на ХЛ корней.
9. Извлечь кювету и промыть ее.
10. Выключить прибор.

## Задание 2

1. Навеску растительной ткани (5 мг) растереть в 1 мл физиологического раствора.
2. Гомогенат центрифугировать в течение 10 минут при 3000 об./мин. Удалить надосадочную жидкость.
3. Приготовить раствор люминола в 0,1 М трис-HCl буфере. Для этого:
  - а) 4,425 мг люминола поместить в чистую сухую посуду;
  - б) добавить 10 мл 1н HCl;
  - в) термостатировать при 60 °С до полного растворения;
  - г) в полученный раствор добавить 6,06 г Триса;
  - д) довести объем раствора до 450 мл дистиллированной водой;
  - е) добавляя 1Н HCl, довести рН раствора до 6,8;
  - ё) довести объем раствора дистиллированной водой до 500 мл.
4. Поместить в кювету 2 мл  $5 \cdot 10^{-4}$  М раствора люминола в 0,1 М трис-HCl буфере (рН 7,4) и 200 мкл исследуемого образца и термостатировать при 30 °С.
5. Поместить кювету в люминометр, зарегистрировать фоновую активность.
6. Внести в кювету с реакционной смесью 450 мкл 0,35 М раствора  $H_2O_2$  и зарегистрировать максимальную быструю вспышку ( $I_{max}$ ).
7. Повторить измерение для 5 проб.
8. Рассчитать светосумму хемилюминесценции с учётом фонового свечения за 100 сек и 500 сек и выразить в относительных единицах (количество импульсов в секунду).
9. Результаты исследования занести в таблицу 2.

Таблица 2

### *Протокол результатов исследования*

Проба	Амплитуда быстрой вспышки (мм)	Светосумма за 100 с	Светосумма за 500 с

### **Вопросы для самоконтроля:**

1. Каким образом можно измерить хемилюминесценцию непигментированной ткани растения?
2. Как влияет осмолярность среды на скорость продукции активных форм кислорода в клетках?

## ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

*Выберите один или несколько правильных вариантов ответов.*

### 1. К АКТИВНЫМ ФОРМАМ КИСЛОРОДА НЕ ОТНОСИТСЯ

- 1) супероксид анион радикал
- 2) перекись водорода
- 3) синглетный кислород
- 4) триплетный кислород

### 2. СИНГЛЕТНЫЙ КИСЛОРОД – ЭТО

- 1) молекулярный кислород в основном состоянии
- 2) молекулярный кислород в возбужденном состоянии
- 3) радикал, образующийся в результате присоединения  $\bar{e}$
- 4) радикал, образующийся при потере  $\bar{e}$

### 3. ИСПУСКАНИЕ КВАНТА СВЕТА НЕ ПРОИСХОДИТ ПРИ

- 1) переходе синглетного кислорода в триплетное состояние
- 2) образования эксимера кислорода
- 3) переходе димеров кислорода в основное состояние
- 4) переходе карбонильных соединений в основное состояние

### 4. ПРИЧИНАМИ НИЗКОЙ ИНТЕНСИВНОСТИ СПОНТАННОГО СВЕЧЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ НЕ ЯВЛЯЮТСЯ

- 1) короткое время жизни синглетного кислорода
- 2) высокая реакционная активность синглетного кислорода
- 3) низкая концентрация активных форм кислорода
- 4) низкая реакционная активность синглетного кислорода

### 5. ПОМЕЩЕНИЕ РАСТИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ В ГИПЕРТОНИЧЕСКУЮ СРЕДУ

- 1) вызывает набухание клеток
- 2) способствует потере воды клетками
- 3) не влияет на функциональное состояние клеток
- 4) снижает скорость продукции активных форм кислорода

## 6. ОСМОТИЧЕСКИЙ ШОК ПРИ ПОМЕЩЕНИИ КЛЕТОК В ГИПЕРТОНИЧЕСКИЙ РАСТВОР ХАРАКТЕРИЗУЕТСЯ

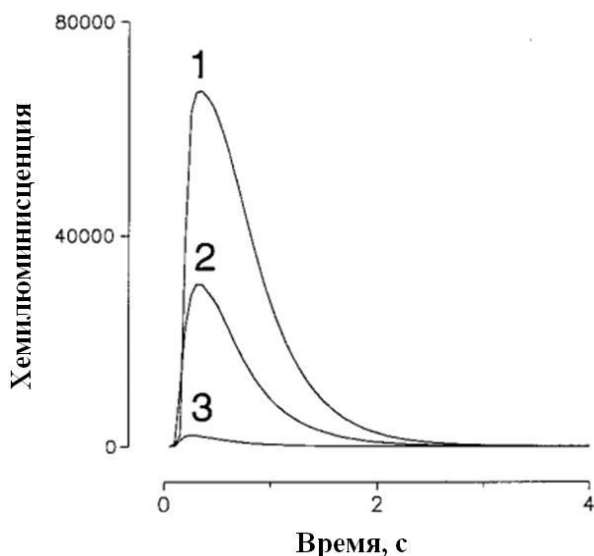
- 1) увеличением скорости достижения максимума хемилюминесценции
- 2) снижением скорости достижения максимума хемилюминесценции
- 3) снижением интенсивности хемилюминесценции
- 4) неизменными интенсивностью и скоростью достижения максимума хемилюминесценции

### СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ

#### Задача 1

При добавлении люминола к гомогенату растительной ткани регистрируется вспышка хемилюминесценции.

*Как повлияет на интенсивность хемилюминесценции добавление ингибитора каталазы аминотриазола?*



**Рис. 4.** Кинетика хемилюминесценции при окислении люминола в присутствии  $H_2O_2$  после инкубации с каталазой в течение 13 с (1), 22 с (2), 60 с (3)

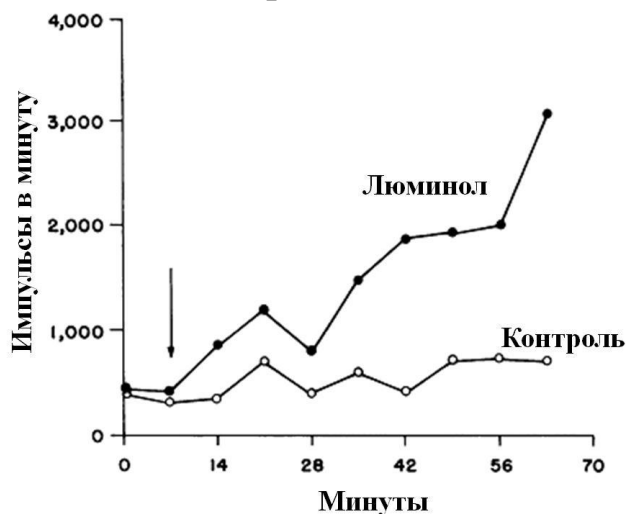
#### Задача 2

При исследовании хемилюминесценции корней гороха использовали люминол (10 мкМ), который добавляли через 7 минут после начала эксперимента и проводили измерение хемилюминесцентного ответа в течение 2 часов. Параллельно регистрировали интенсивность



свечения в контрольных образцах (не содержащих люминол). Полученные результаты представлены на рисунке 5.

*Объясните наблюдаемые различия.*



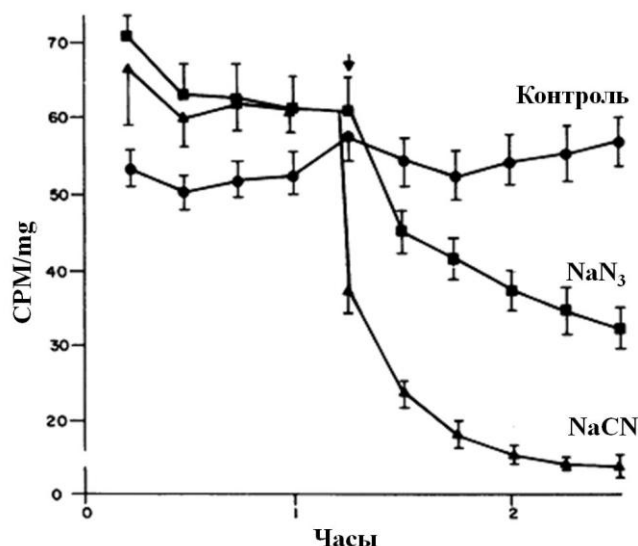
**Рис. 5.** Влияние люминола (10 мкМ) на хемилюминесценцию корней гороха.

*Примечание: стрелкой показано добавление люминола.*

### Задача 3

На рисунке 6 показано влияние ингибиторов пероксидазы  $\text{NaCN}$  и  $\text{NaN}_3$  на хемилюминесценцию корней гороха.

*Поясните изменение интенсивности хемилюминесценции в сравнении с контролем.*



**Рис. 6.** Влияние ингибиторов пероксидазы  $\text{NaCN}$  и  $\text{NaN}_3$  на хемилюминесценцию корней гороха.

*Примечание: стрелкой показано добавление ингибиторов. СРМ/mg – количество импульсов в минуту на миллиграмм.*

## ЗАНЯТИЕ 2

### ИЗМЕРЕНИЕ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ ЛИПОПРОТЕИДОВ, ИНДУЦИРОВАННОЙ ИОНАМИ $Fe^{2+}$

**Цель занятия:** зарегистрировать хемилюминесценцию липопротеидов яичного желтка, индуцированную ионами  $Fe^{2+}$

**Материалы и оборудование:**

**Задание 1:** хемилюминометр; шприц 10 мл; калий-фосфатный буфер (115 мМ KCl, 20 мМ  $KH_2PO_4$ , pH 7,50); трис-буфер (115 мМ KCl, 20 мМ трис, pH 7,50),  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ , дистиллированная вода, яичный желток.

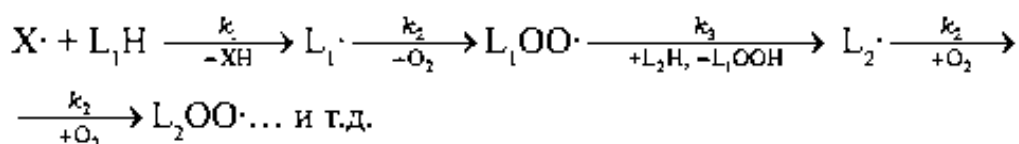
**Задание 2:** хемилюминометр; шприц 10 мл; калий-фосфатный буфер (115 мМ KCl, 20 мМ  $KH_2PO_4$ , pH 7,50),  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ , дистиллированная вода, яичный желток, родамин 6G,  $\alpha$ -нафтол.

**Вопросы для самоподготовки:**

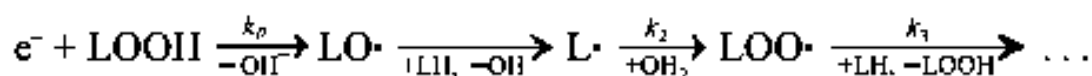
1. Люминесценция, ее виды.
2. Перекисное окисление липидов.
3. Хемилюминесценция в биологических объектах.

### ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

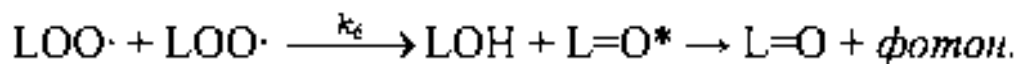
Наиболее распространенная реакция, сопровождающаяся ХЛ в клетках и тканях животных и человека, это реакция перекисного окисления липидов (ПОЛ), которая представляет собой частный случай реакций цепного окисления органических соединений молекулярным кислородом. Цепное окисление представляет собой реакцию, субстратами которой служат полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК), входящие в состав липидов биологических мембран и липопротеинов (ЛН), и молекулярный кислород, а продуктом – гидропероксиды ПНЖК (LOOH). Реакция начинается при появлении в среде активного радикала  $X\cdot$ , которым может быть липидный радикал, то есть радикал ПНЖК, такой как алкил  $L\cdot$ , алкоксил  $LO\cdot$  или диоксил (пероксил)  $LOO\cdot$ , другие органические радикалы и радикал гидроксила  $HO\cdot$ :



Продукты цепного окисления, гидропероксиды липидов LOOH, могут стать источником новых радикалов и, следовательно, источником новых цепей окисления. Например, при реакции одноэлектронного восстановления, в присутствии ионов  $Fe^{2+}$ , либо при пероксидазной реакции, катализируемой гемовыми белками, в том числе цитохромом *c*, связанным с кислыми фосфолипидами на поверхности внутренней мембраны митохондрий:



При этом происходит разветвление цепи окисления, и скорость ПОЛ в системе резко возрастает. В этих реакциях возбужденные молекулы образуются при взаимодействии двух пероксидных радикалов. Для возникновения ХЛ необходимы радикалы LOO·, которые образуются в присутствии кислорода. Наиболее вероятно, что ХЛ при липопероксидации связана с диспропорционированием радикалов LOO·:



Здесь  $k_6$  – константа скорости реакции.

Полная схема реакций перекисного окисления липидов (ПОЛ) включает следующие стадии: инициирования, продолжения, разветвления и обрыва цепей (табл. 3).

Таблица 3

*Основные реакции, связанные с перекисным окислением липидов*

Стадия процесса	Реакции	Константа скорости
Инициирование цепи	0) $Fe^{2+} + O_2 + H^+ \rightarrow Fe^{3+} + HO_2\cdot$	$k_0$
	1) $HO_2\cdot + RH \rightarrow R\cdot + H_2O_2$	$k_1$
	2) $R\cdot + O_2 \rightarrow RO_2\cdot$	$k_2$
Продолжение цепи	3) $RO_2\cdot + RH \rightarrow ROOH + R\cdot$	$k_3$
	2) $R\cdot + O_2 \rightarrow RO_2\cdot$	$k_2$

Разветвление цепи	4) $\text{ROOH} + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{RO}\cdot + \text{OH}^- + \text{Fe}^{3+}$	$k_p$
	5) $\text{RO}\cdot + \text{RH} \rightarrow \text{ROH} + \text{R}\cdot$	$k_5$
	2) $\text{R}\cdot + \text{O}_2 \rightarrow \text{RO}_2\cdot$	$k_2$
Обрыв цепи	6) $\text{RO}_2\cdot + \text{RO}_2\cdot \rightarrow \text{P}^* \rightarrow \text{P} + h\nu$	$k_6$
	7) $\text{RO}_2\cdot + \text{InH} \rightarrow \text{ROOH} + \text{In}\cdot$	$k_7$
	8) $\text{In}\cdot + \text{RO}_2\cdot \rightarrow \text{Y}$	$k_8$
	9) $\text{RO}_2\cdot$ (или $\text{R}\cdot$ ) + $\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{X}$	$k_9$
Восстановление железа	10) $\text{Z}^n + \text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Z}^{n+1} + \text{Fe}^{2+}$	$k_{10}$

Обозначения:  $\text{R}\cdot$  – радикал ненасыщенной жирной кислоты (НЖК),  $\text{RO}_2\cdot$  – перекисный радикал НЖК,  $\text{P}$ ,  $\text{X}$ ,  $\text{Y}$  – молекулярные продукты,  $\text{InH}$  – молекула антиоксиданта,  $\text{In}\cdot$  – свободный радикал антиоксиданта,  $\text{Z}$  – соединение, способное восстанавливать  $\text{Fe}^{2+}$ .

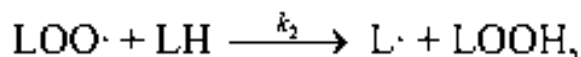
Регистрация ХЛ при цепном окислении позволяет измерять кинетику изменения стационарной концентрации свободных радикалов в системе во времени, а вместе с тем – измерять скорость реакции ПОЛ в каждый данный момент времени.

Найдем связь между концентрацией радикалов  $\text{LOO}\cdot$  и интенсивностью свечения  $I_{\text{CL}}$  из уравнения реакции:

$$I_{\text{CL}} = Q_{\text{CL}} k_6 [\text{LOO}\cdot]^2.$$

Здесь  $I_{\text{CL}}$  – общий световой поток ХЛ во всех направлениях и при всех длинах волн, Эйнштейн/с;  $Q_{\text{CL}}$  – квантовый выход ХЛ.

Скорость процесса пероксидного окисления – это скорость образования продуктов окисления гидропероксидов в реакции:



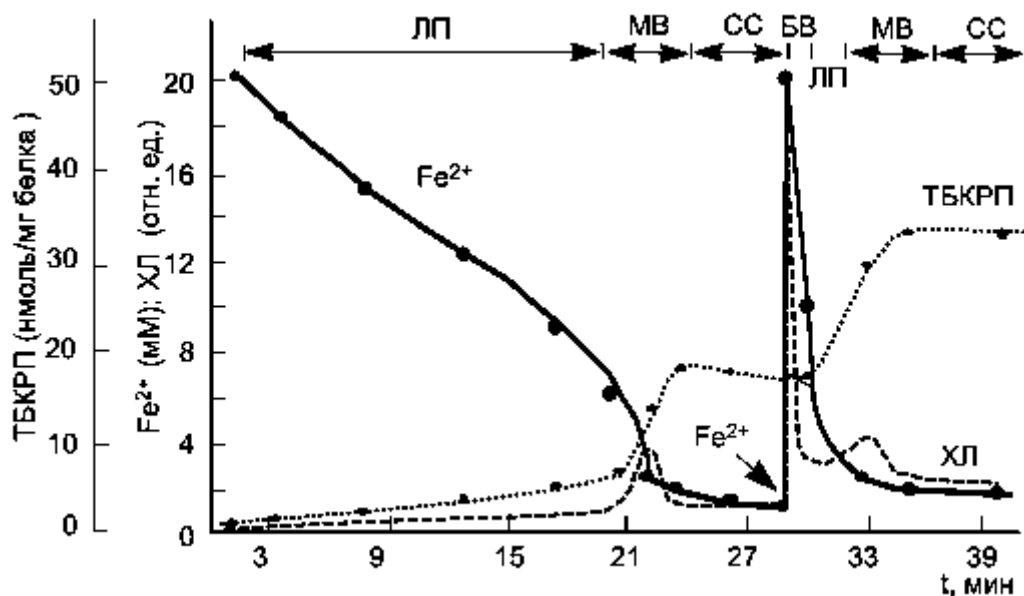
где  $k_2$  – константа скорости этой реакции.

$$d[\text{LOOH}]/dt = k_2[\text{RH}][\text{LOO}\cdot] = k_2[\text{RH}]\sqrt{I_{\text{CL}}/(Q_{\text{CL}}k_6)}.$$

Следовательно, скорость пероксидного окисления пропорциональна стационарной концентрации свободных радикалов в системе и связана с интенсивностью ХЛ. Поэтому регистрируя интенсивность ХЛ можно следить за изменениями во времени скорости пероксидного окисления липидов, то есть изучать кинетику этого процесса, а тем самым и его механизм.

## Кинетика железо-индуцированной хемилюминесценции

Описанный выше параллелизм между интенсивностью собственной ХЛ, сопровождающей цепное окисление липидов, и скоростью цепного окисления четко проявляется при изучении довольно сложной кинетики ХЛ в липид-содержащих системах, включая липосомы и митохондрии, к суспензии которых добавлено некоторое количество солей  $Fe^{2+}$ . Типичная кинетика ХЛ при реакции цепного окисления липидов, инициированной добавлением к исследуемой системе солей двухвалентного железа, показана на рисунке 7 и включает в себя ряд последовательных стадий.



**Рис. 7.** Кинетика окисления ионов  $Fe^{2+}$  (сплошная линия), образования продуктов перекисного окисления липидов (реактивные продукты тиобарбитуровой кислоты, тБКРП) (точечная линия) и хемилюминесценции (пунктирная линия) в суспензии митохондрий, к которой добавлены 0,2 мМ  $Fe^{2+}$  (момент введения показан стрелкой). ЛП – латентный период, БВ – быстрая вспышка, МВ – медленная вспышка, СС – стационарное свечение

Непосредственно после добавления ионов  $Fe^{2+}$  наблюдается быстрая вспышка свечения, связанная с разложением гидропероксидов липидов, если они содержались в объектах, которая сменяется фазой угнетения свечения. Эта стадия обусловлена антиоксидантными свойствами  $Fe^{2+}$  при его достаточно высоких концентрациях (порядка 50 мкМ в суспензиях митохондрий и липосом). При снижении концентрации  $Fe^{2+}$  ниже этого критического значения ионы  $Fe^{2+}$  начинают работать как прооксиданты за счет реакции разветвления цепей, в результате чего развивается так называемая медленная вспышка свечения. Она затухает после полного окисления  $Fe^{2+}$  до

$\text{Fe}^{3+}$ . Однако процесс на этом не заканчивается, так как вслед за этим в суспензии липосом, митохондрий и в плазме крови постепенно развивается так называемое стационарное свечение (рис. 7). Исследование кинетики такой ХЛ в сочетании с определением окисления  $\text{Fe}^{2+}$ , потребления кислорода и математическим моделированием реакций позволило расшифровать систему уравнений разветвленного цепного окисления липидов, определить константы скоростей основных реакций, а также изучить механизм действия и активность различных антиоксидантов, как природных, так и синтетических.

## ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

### Задание 1

**Исследование влияния ионов фосфата на кинетику индуцированной ионами  $\text{Fe}^{2+}$  хемилюминесценции суспензии желточных липопротеидов**

1. Приготовить следующие буферные растворы: (1) 200 мл калий-фосфатного буфера (115 мМ  $\text{KCl}$ , 20 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,50); (2) 100 мл трис-буфера (115 мМ  $\text{KCl}$ , 20 мМ трис, pH 7,50).
2. Приготовить 50 мл закисленного водного раствора сернокислого железа ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) в концентрации  $10^{-2}$  М. Для того чтобы двухвалентное железо в растворе не окислилось преждевременно, в стаканчик с сухой навеской соли *перед* введением воды необходимо добавить 1–2 капли концентрированной соляной кислоты. Правильно приготовленный раствор практически бесцветен (может наблюдаться слабый зеленоватый оттенок), прозрачен и не содержит осадков.
3. Приготовить суспензию липопротеидов желтка куриного яйца. Для этого:
  - а) осторожно отделить желток яйца от белка, стараясь добиться минимального загрязнения желтка белком;
  - б) одну объемную часть свежего желтка смешать с 5 объемными частями калий-фосфатного буфера ( $\text{KCl}$  115 мМ;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  20 мМ, pH 7,5);
  - в) полученную смесь поместить на магнитную мешалку и подвергнуть интенсивному перемешиванию в течение 10–15 мин;

г) готовой суспензии яичного липопротеида дать отстояться при комнатной температуре до опадания образовавшейся при перемешивании пены.

Важно помнить, что в образцы, предназначенные для измерения кинетики, индуцированной ионами  $\text{Fe}^{2+}$ , готовая суспензия яичных липопротеидов добавляется в количестве 1/10 общего объема образца. Остальную часть составляют буферные растворы и добавки (если таковые необходимы). При введении добавок количество добавляемого буферного раствора снижается на объем раствора добавки!

4. Приготовить следующие образцы:

– 1 мл суспензии яичных липопротеидов + 9 мл фосфатного буфера (1);

– 1 мл суспензии яичных липопротеидов + 9 мл трис-буфера (2).

5. Измерить кинетику хемилюминесценции образца (1), содержащего 1 мл суспензии яичных липопротеидов + 9 мл фосфатного буфера. Для этого индуцировать свечение введением 1 мл раствора сернокислого железа. Если в течение 15 минут с момента введения  $\text{Fe}^{2+}$  в образец «медленная» вспышка хемилюминесценции не наблюдается, повторить измерения, изменив объем вводимого раствора сернокислого железа.

6. Измерить кинетику хемилюминесценции образца (2), содержащего 1 мл суспензии яичных липопротеидов + 9 мл трис-буфера. При этом следует индуцировать свечение тем же количеством сернокислого железа, которое было использовано в предыдущем пункте.

7. На основании полученных кинетик рассчитать и сопоставить величины латентных периодов начала развития «медленной» вспышки в фосфатном буфере и в трис-буфере. В выводах объяснить причины полученных различий.

## **Задание 2**

**Исследование влияния активаторов и тушителей на индуцированную ионами  $\text{Fe}^{2+}$  хемилюминесценцию яичных липопротеидов**

1. Приготовить по 5 мл растворов родамина 6G и  $\alpha$ -нафтола в фосфатном буфере. Раствор родамина готовится путем разведения маточного, концентрированного, раствора в 10 раз. Практически нерастворимый в водных средах  $\alpha$ -Нафтол используется в виде суспензии. Для ее приготовления в 5 мл фосфатного буфера вво-

дится минимально возможное количество сухого  $\alpha$ -нафтола («на кончике скальпеля»), и суспензия интенсивно перемешивается. Перед применением эту суспензию необходимо вновь интенсивно перемешать.

2. Приготовить следующие образцы:
  - (1) 1 мл суспензии яичных липопротеидов + 1 мл суспензии  $\alpha$ -нафтола + 8 мл фосфатного буфера;
  - (2) 1 мл суспензии яичных липопротеидов + 2 мл суспензии  $\alpha$ -нафтола + 7 мл фосфатного буфера;
  - (3) 1 мл суспензии яичных липопротеидов + 1 мл раствора родамина 6G + 8 мл фосфатного буфера;
  - (4) 1 мл суспензии яичных липопротеидов + 2 мл раствора родамина 6G + 7 мл фосфатного буфера.
3. Измерить кинетики хемилюминесценции этих образцов, инициируя их раствором сернокислого железа в объеме, определенном при выполнении задания 1.
4. Сопоставить латентные периоды начала развития «медленной» вспышки свечения и амплитуды вспышек в этих образцах и в образце яичных липопротеидов в фосфатном буфере без добавок, проанализированном в ходе выполнения задания 1. На основании этого сопоставления сделать вывод о том, какое из вводимых в пробы веществ является тушителем, а какое – активатором хемилюминесценции, и оценить тип тушения (активации).
5. Отразить в отчете:
  - 1) кинетику индуцированной ионами  $\text{Fe}^{2+}$  хемилюминесценции яичных липопротеидов в фосфатном буфере и в трис-буфере;
  - 2) расчетные значения латентных периодов начала «медленной» вспышки свечения в этих образцах в секундах;
  - 3) кинетику индуцированной ионами  $\text{Fe}^{2+}$  хемилюминесценции яичных липопротеидов в фосфатном буфере в присутствии добавок (согласно Заданию 2);
  - 4) значения латентных периодов начала «медленной» вспышки свечения и амплитуд вспышек в этих образцах.

### **Вопросы для самоконтроля:**

1. Как влияют ионы фосфата на кинетику индуцированной ионами  $\text{Fe}^{2+}$  хемилюминесценции яичных липопротеидов? С чем связано это влияние?



2. Какое из двух вводимых в образцы веществ (родамин 6G и  $\alpha$ -нафтол) является активатором, а какое – тушителем хемилюминесценции? Каков механизм активации (тушения)? Обоснуйте ваши выводы полученными результатами.

## ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

*Выберите один или несколько правильных вариантов ответов.*

### 1. ПРОДУКТОМ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ ЯВЛЯЮТСЯ

- 1) гидропероксиды липидов
- 2) жирные кислоты
- 3) молекулярный кислород
- 4) перекись водорода

### 2. ИНТЕНСИВНОСТЬ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ $I_{CL}$ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ КОНЦЕНТРАЦИИ РАДИКАЛОВ $LOO\cdot$ НАХОДИТСЯ ПО ФОРМУЛЕ

- 1)  $I_{cl} = Q_{cl} k [LOO \cdot]^2$
- 2)  $I_{cl} = k [LOO \cdot]^2$
- 3)  $I_{cl} = Q_{cl} [LOO \cdot]^2$
- 4)  $I_{cl} = Q_{cl} k [LOO \cdot]^2$

### 3. СКОРОСТЬ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ МОЖНО РАССЧИТАТЬ КАК

- 1) скорость образования гидропероксидов
- 2) скорость распада гидропероксидов
- 3)  $d[LOOH] / dt = k RH [LOO \cdot]$
- 4)  $d^2[LOOH] / dt^2 = k RH [LOO \cdot]$

### 4. БЫСТРАЯ ВСПЫШКА ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ ПРИ ДОБАВЛЕНИИ ИОНОВ $Fe^{2+}$ К ЛИПИДАМ ОБУСЛОВЛЕНА

- 1) образованием гидропероксидов липидов
- 2) разложением гидропероксидов липидов
- 3) антиоксидантными свойствами  $Fe^{2+}$
- 4) окислением  $Fe^{2+}$  до  $Fe^{3+}$

5. УГНЕТЕНИЕ БЫСТРОЙ ВСПЫШКИ ХЕМИЛМИНЕСЦЕНЦИИ, ВЫЗВАННОЙ ДОБАВЛЕНИЕМ ИОНОВ  $Fe^{2+}$  К ЛИПИДАМ, ОБУСЛОВЛЕНО

- 1) образованием гидропероксидов липидов
- 2) разложением гидропероксидов липидов
- 3) антиоксидантными свойствами  $Fe^{2+}$
- 4) окислением  $Fe^{2+}$  до  $Fe^{3+}$

6. УГНЕТЕНИЕ МЕДЛЕННОЙ ВСПЫШКИ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ, ВЫЗВАННОЙ ДОБАВЛЕНИЕМ ИОНОВ  $Fe^{2+}$  К ЛИПИДАМ, ОБУСЛОВЛЕНО

- 1) образованием гидропероксидов липидов
- 2) разложением гидропероксидов липидов
- 3) антиоксидантными свойствами  $Fe^{2+}$
- 4) окислением  $Fe^{2+}$  до  $Fe^{3+}$

## СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ

### Задача 1

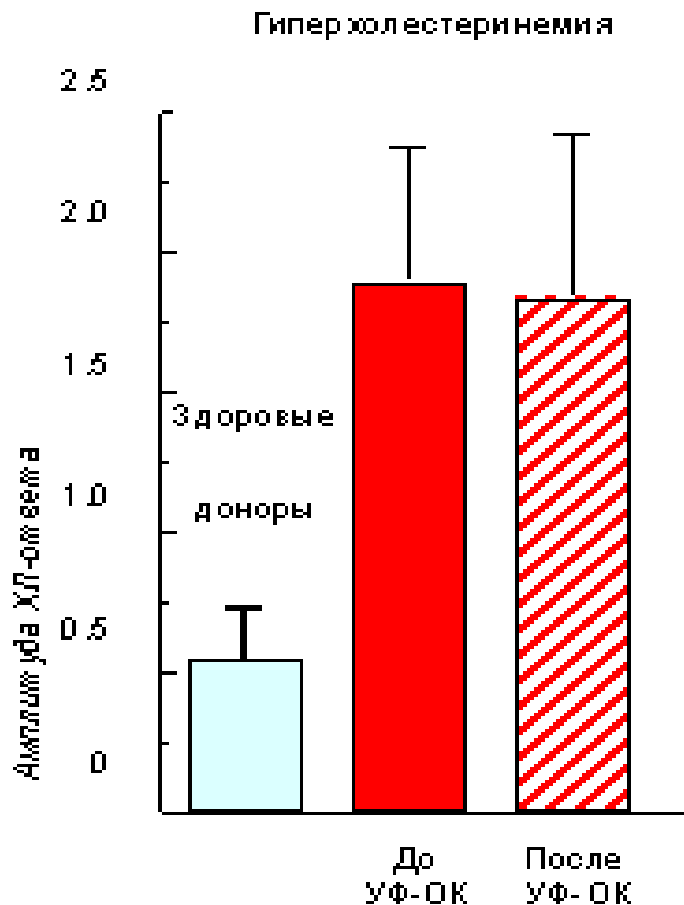
При семейной гиперхолестеринемии содержание холестерина в крови резко повышено и имеется выраженная предрасположенность к раннему развитию атеросклероза. При этом у больных с гиперхолестеринемией хемилюминесцентный ответ клеток крови на стимул почти в четыре раза превышает ответ клеток здоровых доноров. В качестве лечения было предложено облучение крови ультрафиолетовым светом (УФ-ОК), после чего было проведено повторное измерение хемилюминесцентного ответа. Результаты измерений представлены на рисунке 8.

*Какое можно сделать заключение об эффективности процедуры?*

### Задача 2

Для усиления хемилюминесценции используют люминол, который является эффективным активатором хемилюминесценции реактива Фентона (перекись водорода с солями  $Fe^{2+}$ ) и ксантинооксидазной системы, но неэффективен в отношении липоксигеназной системы.

*Целесообразно ли использование люминола при изучении перекисного окисления липидов? Почему?*

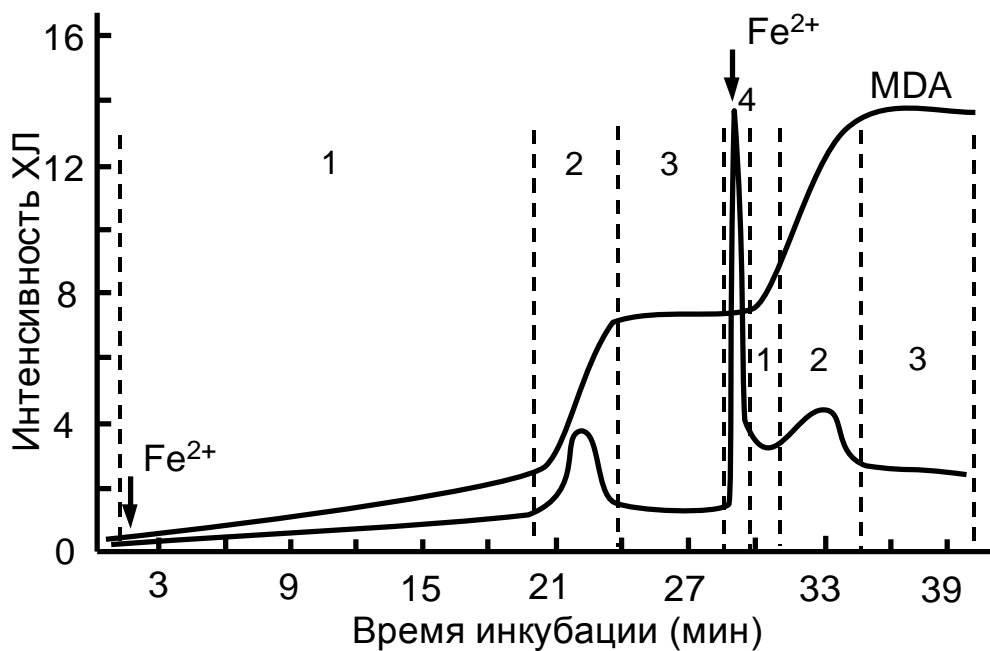


**Рис. 8.** Хемилюминесцентные ответы клеток здоровых доноров и больных семейной гиперхолестеринемией

### Задача 3

Для исследования кинетики перекисного окисления липидов к суспензии митохондрий добавляли соли  $Fe^{2+}$ . По ходу реакций отбирали пробы на анализ  $Fe^{2+}$ , малонового диальдегида, непрерывно регистрировали свечение. Анализ кинетики хемилюминесценции показал, что при первом добавлении ионов  $Fe^{2+}$  интенсивность свечения медленно увеличивалась, а затем снижалась («медленная вспышка»), переходя на некий стационарный уровень. При повторном добавлении  $Fe^{2+}$  к суспензии митохондрий наблюдали два пика: «быстрая вспышка» хемилюминесценции, которая характеризовалась высокой интенсивностью свечения и быстрым протеканием во времени, и «медленная вспышка» меньшей амплитуды (рис. 9).

*Объясните причины появления быстрой и медленной вспышки.*



**Рис. 9.** Кинетика хемилюминесценции и накопления малонового диальдегида (MDA) при добавлении к суспензии митохондрий ионов  $Fe^{2+}$

*Примечание: цифрами обозначены стадии хемилюминесценции. 1 – латентный период; 2 – медленная вспышка; 3 – стационарное свечение; 4 – быстрая вспышка. Стрелками указаны моменты добавления  $FeSO_4$*

## ЗАНЯТИЕ 3

### ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОДУКЦИИ ПЕРЕКИСИ ВОДОРОДА В КЛЕТКАХ МЕТОДОМ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО АНАЛИЗА

**Цель занятия:** оценить скорость продукции перекиси водорода клетками и изолированными митохондриями методом хемилюминесцентного анализа.

**Материалы и оборудование:**

**Задание 1:** хемилюминометр, шприц 10 мл, 4 кюветы для хемилюминометра, 2 пипетки на 2 мл, 4 пробирки, дозатор регулируемого объема (0,5–10 мкл), 6 наконечников для дозатора, люминол (2 мМ в фосфатном буфере PBS), пероксидаза хрена (2 мг/мл в фосфатном буфере PBS), бета-лапахон (1 мМ в диметилсульфоксиде), каталаза (100,000 ед/мл в фосфатном буфере PBS), фосфатный буфер PBS, диметилсульфоксид.

**Задание 2:** хемилюминометр, шприц 10 мл, 4 кюветы для хемилюминометра, 2 пипетки на 2 мл, 5 пробирок, дозатор регулируемого объема (0,5–10 мкл), 7 наконечников для дозатора, люминол (2 мМ в фосфатном буфере PBS), пероксидаза хрена (2 мг/мл в фосфатном буфере PBS), β-лапахон (1 мМ в диметилсульфоксиде), каталаза (100,000 ед/мл в фосфатном буфере PBS), фосфатный буфер PBS, диметилсульфоксид, раствор двухосновного гексагидрата сукцината натрия (0.5 М в деионизированной воде).

**Вопросы для самоподготовки:**

1. Образование перекиси водорода в клетках и митохондриях.
2. Ферменты, участвующие в образовании и разрушении активных форм кислорода в клетках.

### ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

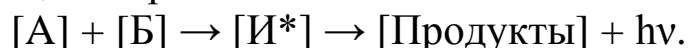
Перекись водорода ( $H_2O_2$ ) относится к активным формам кислорода (АФК). В отличие от супероксид анион радикала,  $H_2O_2$  относительно стабильна и проходит через мембраны клеток путем диффузии через каналы аквапорины. В высоких концентрациях  $H_2O_2$  вызывает

окислительный стресс и повреждение клеток и тканей, а в низких концентрациях – выступает в роли вторичного посредника, участвующего в передаче внутриклеточных сигналов. Поэтому определение и измерение  $H_2O_2$  в биологических системах важно при изучении физиологической и патофизиологической роли АФК. Измерение  $H_2O_2$  можно проводить разными методами, среди которых: (1) флуоресцентный метод (на основе окисления N-ацетил-3,7-дигидроксифеноксазина); (2) хемилюминесцентный метод (с использованием люминола и пероксидазы хрена); (3) измерение  $H_2O_2$  с помощью электродов.

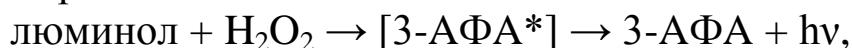
Описанный в работе метод хемилюминесцентного анализа позволяет измерить внеклеточное содержание  $H_2O_2$ .

### 1. Принцип хемилюминесцентного анализа

Хемилюминесценция – излучение света с ограниченным выделением тепла в результате протекания химических реакций. Схема реакции, протекающей между реагентами А и Б с образованием промежуточного возбужденного продукта (интермедиата)  $I^*$ , может быть записана следующим образом:



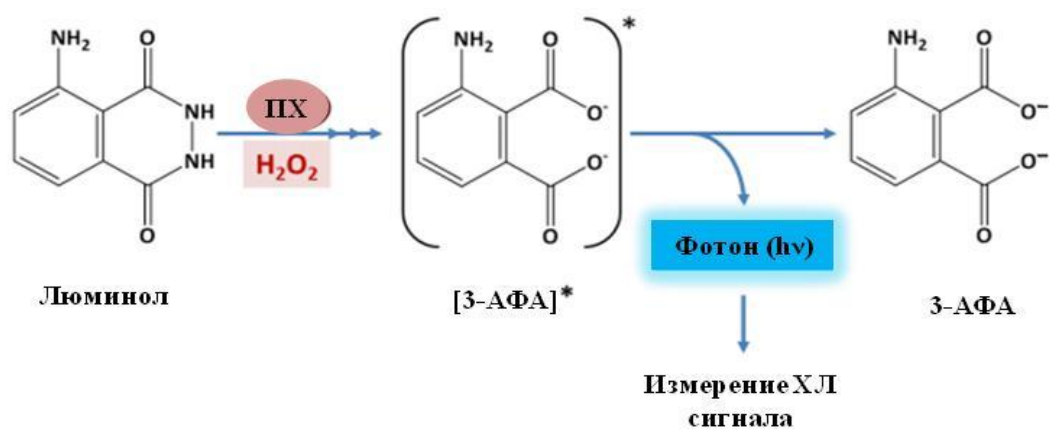
Так, реакция между люминолом (реагент А) и  $H_2O_2$  (реагент Б) в присутствии миелопероксидазы или пероксидазы хрена протекает следующим образом:



где 3-АФА – 3-аминофталат, 3-АФА\* – возбужденный 3-аминофталат.

Релаксация 3-АФА\* на более низкий энергетический уровень приводит к высвобождению фотона (рис. 10).

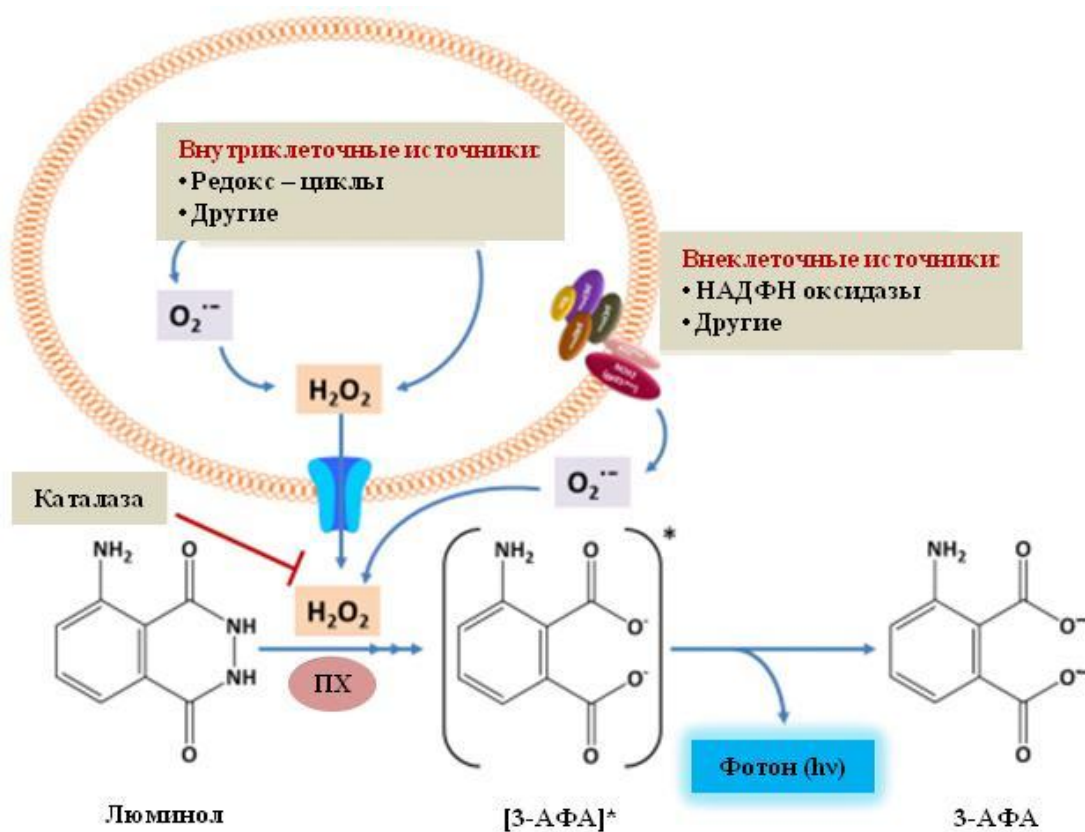
Измеряя фотонную эмиссию люминометром можно определить скорость образования  $H_2O_2$  в биологической системе. Так как приведенная в примере реакция зависит от пероксидазы хрена, которая не проникает через клеточную мембрану внутрь клетки, хемилюминесцентная реакция, протекающая с участием люминола и пероксидазы хрена, показывает уровень  $H_2O_2$ , выделяемого во внеклеточную среду. Для определения конкретных видов АФК пробу (люминол) вместе с требуемыми реагентами (пероксидаза хрена) инкубируют в системе, генерирующей АФК (ферменты, клетки, ткани), после чего с помощью люминометра измеряют интенсивность испускаемого света.



**Рис. 10.** Основные химические реакции с участием люминола, сопровождающиеся хемилюминесценцией. В присутствии пероксидазы хрена (ПХ) люминол взаимодействует с перекисью водорода с образованием 3-аминофталата в возбужденном состоянии (3-АФА\*). 3-АФА\* переходит на нижний энергетический уровень с испусканием кванта света.

## 2. Принцип оценки хемилюминесцентной реакции люминол/пероксидаза хрена

Как отмечалось выше, люминол окисляется  $H_2O_2$  в присутствии пероксидазы хрена с испусканием квантов света. Эта реакция может быть использована для определения внеклеточной концентрации  $H_2O_2$ . Современные люминометры позволяют в режиме реального времени регистрировать хемилюминесцентные реакции при различных температурах, что может дать важную информацию о скорости выброса  $H_2O_2$  во внеклеточную среду. Так как  $H_2O_2$ , как и вода, диффундирует через мембрану клеток посредством аквапоринов, то  $H_2O_2$ , образуемый внутри клетки, может выделяться во внеклеточную среду. Таким образом, определяя внеклеточную концентрацию  $H_2O_2$ , можно определить скорость образования  $H_2O_2$  внутри клетки. Это особенно полезно для изучения окислительно-восстановительных процессов внутри клеток, протекающих с образованием  $H_2O_2$  (рис. 11). Следует отметить, что в хемилюминесцентных реакциях, протекающих при участии люминола и пероксидазы хрена, могут быть использованы окислители, отличные от  $H_2O_2$ . Для определения специфичности хемилюминесцентных реакций, протекающих при участии люминола и пероксидазы хрена, в реакционную смесь можно добавить каталазу – фермент, катализирующий разложение  $H_2O_2$  на воду и молекулярный кислород.



**Рис. 11.** Определение содержания внеклеточной перекиси водорода с помощью хемилюминесцентной (ХЛ) реакции, опосредованной люминолом и пероксидазой хрена (ПХ). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, находящийся во внеклеточной среде, образуется мембраносвязанными ферментами (например, НАДФН оксидаза) или поступает из клетки, где образуется при протекании редокс-циклов. В последнем случае H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> поступает во внеклеточное пространство посредством облегченной диффузии через аквапорины. Использование каталазы при проведении ХЛ реакции позволяет идентифицировать H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> во внеклеточной среде.

## ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

### Задание 1

**Определение продукции перекиси водорода в клетках методом хемилюминесцентного анализа**

1. Приготовить растворы:

а) раствор люминола (2 мМ в фосфатном буфере PBS): 7,96 мг натриевой соли люминола (M=199.14 моль/л) растворить в 2 мл буфера PBS (поместить аликвоты в микроцентрифужные пробирки и хранить при -20 °С);



б) раствор пероксидазы хрена (ПХ) (2 мг/мл в буфере PBS): 4 мг ПХ растворить в 2 мл PBS (поместить аликвоты в микроцентрифужные пробирки и хранить при  $-20^{\circ}\text{C}$ );

в) раствор  $\beta$ -лапахона ( $\beta$ -Larachone, 1 мМ в диметилсульфоксиде (ДМСО)): добавить 2,06 мл ДМСО в пробирку, содержащую 5 мг бета-лапахона ( $M = 242,27$  моль/л), а затем развести полученный раствор (10 мМ) в ДМСО до получения раствора с концентрацией 1 мМ;

г) раствор каталазы (100,000 ед/мл в буфере PBS): 50 мг каталазы (2,300 ед/мг) растворить в 1,15 мл PBS (поместить аликвоты в микроцентрифужные пробирки и хранить при  $-20^{\circ}\text{C}$ ).

2. Провести измерения согласно протоколу:

1) поместить  $1 \times 10^6$  клеток в 4 микроцентрифужные пробирки с последующим центрифугированием для осаждения клеток и удаления среды. Храните клетки на льду;

2) добавьте 5 мкл раствора люминола (2 мМ) в каждую из 4-х пробирок для хемилюминесцентного анализа;

3) добавьте 5 мкл ПХ (2 мг/мл) в пробирки для хемилюминесцентного анализа под номерами 1, 2 и 4. Добавьте 5 мкл PBS в пробирку для хемилюминесцентного анализа под номером 3;

4) добавьте 5 мкл каталазы (100,000 ед/мл) в пробирку 4. Добавьте 5 мкл PBS в пробирки 1, 2 и 3;

5) добавьте 1 мкл 1 мМ бета-лапахона в пробирки 2, 3 и 4. Добавьте 1 мкл ДМСО в пробирку 1.

6) 984 мкл полного фосфатного буфера (8.1 мМ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1.47 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 138 мМ  $\text{NaCl}$ , 2.67 мМ  $\text{KCl}$ , 0.5 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 0.7 мМ  $\text{CaCl}_2$  и 0.1% глюкоза, рН 7.4), нагретого до  $37^{\circ}\text{C}$  и насыщенного воздухом, добавьте в пробирку 1, содержащую  $1 \times 10^6$  клеток, как указано выше в п.1, чтобы ресуспендировать клетки. Перенесите всю клеточную суспензию в пробирку №1, немедленно перемешайте и регистрируйте хемилюминесцентный ответ при  $37^{\circ}\text{C}$  в течение 30 минут.

7) Повторите для остальных трех пробирок.

8) Измерьте фоновый уровень хемилюминесценции с помощью пробирок, содержащих все реагенты / компоненты, но не клетки.

9) Вычтите значения фоновой хемилюминесценции из значений хемилюминесценции опытных образцов. Полученные величины отражают хемилюминесцентный ответ, обусловленный активностью клеток.

## Задание 2

### Определение продукции перекиси водорода в митохондриях методом хемилюминесцентного анализа

1. Приготовьте растворы:

а) раствор люминола (2 мМ в PBS): как описано выше;

б) раствор ПХ (2 мг/мл в PBS): как описано выше;

в) раствор  $\beta$ -лапахона (1 мМ в ДМСО): как описано выше;

г) раствор каталазы (100,000 ед/мл в PBS): как описано выше;

д) раствор сукцината (0.5 М в деионизированной воде: 1.35 г двухосновный гексагидрат сукцината натрия (sodium succinate dibasic hexahydrate,  $M = 270.14$  моль/л) растворить в 10 мл деионизированной воды (поместить аликвоты в микроцентрифужные пробирки и хранить при  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

2. Провести измерения согласно протоколу:

1) добавить 5 мкл 0.5 М раствора сукцината в каждую из 4 пробирок для хемилюминесцентного анализа;

2) добавить 5 мкл 2 мМ раствора люминола в каждую из 4 пробирок для хемилюминесцентного анализа;

3) добавить 5 мкл раствора ПХ (2 мг/мл) в пробирки 1, 2 и 4. Добавить 5 мкл PBS в пробирку 3;

4) Добавить 5 мкл каталазы (100,000 ед/мл) в пробирку 4. Добавить 5 мкл PBS в пробирки 1, 2 и 3;

5) добавить 1 мкл 1 мМ раствора  $\beta$ -лапахона в пробирки 2, 3 и 4. Добавить 1 мкл ДМСО в пробирку 1;

6) 974 мкл буфера для дыхания митохондрий, нагретого до  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  и насыщенного воздухом, добавить в пробирку 1, после этого внести в пробирку 5 мкл суспензии митохондрий (1 мг/мл). После смешивания перенести пробирку в люминометр и регистрировать хемилюминесцентный ответ при  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  в течение 30 минут;

7) повторить п. 6 для остальных пробирок;

8) измерьте фоновый уровень хемилюминесценции с помощью пробирок, содержащих все реагенты / компоненты, но не митохондрии;

9) вычтите значения фоновой хемилюминесценции из значений хемилюминесценции опытных образцов. Полученные величины отражают хемилюминесцентный ответ, обусловленный активностью митохондрий.

### Вопросы для самоконтроля

1. Каким образом можно определить скорость продукции перекиси водорода клетками?
2. Каким образом можно определить скорость продукции перекиси водорода митохондриями?
3. Как подтвердить, что хемилюминесцентный сигнал обусловлен продукцией перекиси водорода?

### ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

*Выберите один или несколько правильных вариантов ответов.*

#### 1. АКВАПОРИНЫ – ЭТО

- 1) каналы, осуществляющие пассивный транспорт воды
- 2) АТФ-зависимый транспорт воды
- 3) вторично-активный транспорт воды и ионов
- 4) неселективные ионные каналы

#### 2. ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНАЯ РЕАКЦИЯ, ПРОТЕКАЮЩАЯ С УЧАСТИЕМ ЛЮМИНОЛА И ПЕРОКСИДАЗЫ ХРЕНА, ПОЗВОЛЯЕТ ОПРЕДЕЛИТЬ

- 1) содержание  $H_2O_2$  во внутриклеточной среде
- 2) содержание  $H_2O_2$  во внеклеточной среде
- 3) активность НАДФН оксидазы
- 4) активность миелопероксидазы

#### 3. ПЕРОКСИДАЗА ХРЕНА УЧАСТВУЕТ В РЕАКЦИИ

- 1) окисления люминола перекисью водорода
- 2) образования перекиси водорода из супероксид анион радикала
- 3) катализирует разложение  $H_2O_2$  на воду и молекулярный кислород
- 4) активации НАДФН оксидазы

#### 4. С ПОМОЩЬЮ ПЕРОКСИДАЗЫ ХРЕНА МОЖНО ОПРЕДЕЛИТЬ ТОЛЬКО ВНЕКЛЕТОЧНУЮ КОНЦЕНТРАЦИЮ ПЕРЕКИСИ ВОДОРОДА, ПОТОМУ ЧТО

- 1) концентрация перекиси водорода во внеклеточной среде выше, чем во внутриклеточной среде

- 2) пероксидаза хрена не проникает через мембрану клетки
- 3) внутриклеточные ферменты разрушают пероксидазу хрена
- 4) пероксидаза хрена неактивна при значениях рН внутри клетки

## 5. ТРАНСПОРТ ПЕРЕКИСИ ВОДОРОДА ИЗ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ ВО ВНЕКЛЕТОЧНУЮ СРЕДУ

- 1) опосредован аквапоринами
- 2) осуществляется  $\text{Na}^+$ -зависимым вторично-активным транспортом
- 3) проходит путем растворения в липидном бислое плазматической мембраны
- 4) невозможен

## 6. ФЕРМЕНТ КАТАЛАЗА

- 1) способствует окислению люминола перекисью водорода
- 2) разлагает  $\text{H}_2\text{O}_2$  на воду и молекулярный кислород
- 3) осуществляет переход  $\text{H}_2\text{O}_2$  на основной энергетический уровень с испусканием кванта света
- 4) способствует образованию  $\text{H}_2\text{O}_2$  из супероксид анион радикала.

## СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ

### Задача 1

На поверхности свежей раны выделяется раневой экссудат, который содержит каталазу, которая разлагает перекись водорода без образования свободных радикалов, а также гем-содержащие белки и ионы железа, которые катализируют разложение перекиси водорода с образованием АФК. Последние токсичны для клеток окружающей ткани.

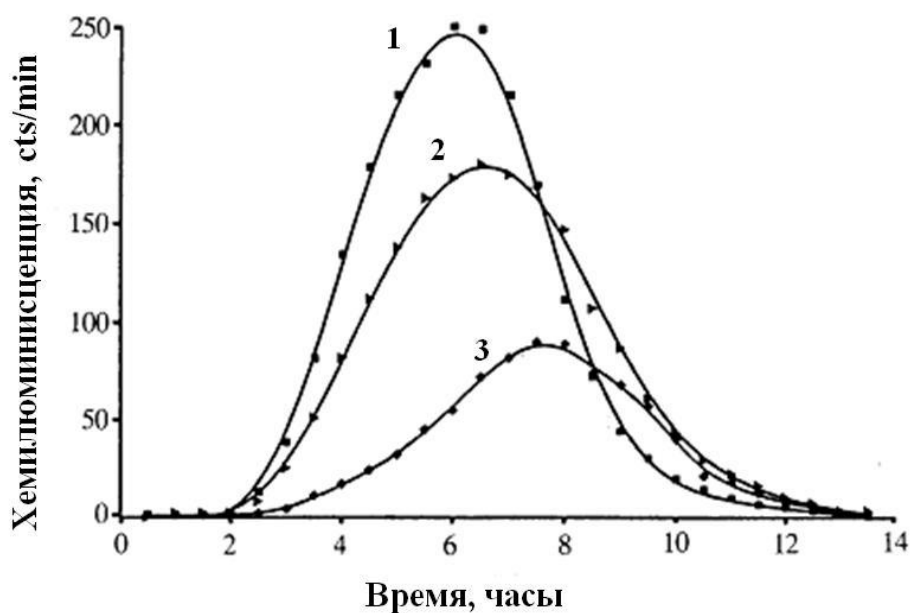
*Как оценить продукцию перекиси водорода в ране?*

*Как, используя метод хемилюминисцентного анализа, оценить процесс заживления раны?*

### Задача 2

При исследовании влияния каталазы на хемилюминесценцию амёбы *Dictyostelium discoideum* наблюдалось снижение интенсивности хемилюминесценции (рис. 12).

*Объясните полученные результаты.*



**Рис. 12.** Влияние каталазы на хемилюминесценцию *D. discoideum*.  
 Кривая 1 получена в отсутствии каталазы (контроль),  
 кривые 2 и 3 – при добавлении 145 мкг/мл и 1,45 мг/мл каталазы,  
 соответственно. Cts/min – эмиссия света в минуту  
 (эмиссия света рассчитана как площадь под кривой)

### Задача 3

У больных инфарктом миокарда в моче могут появиться очень небольшие количества миоглобина. Возможно ли обнаружение миоглобина в моче методом хемилюминисцентного анализа? Что для этого нужно сделать? Добавление к образцу мочи такого больного люминола и перекиси водорода способствует появлению хемилюминесцентного свечения.

*Почему?*

## ЗАНЯТИЕ 4

### ПРОВЕДЕНИЕ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО АНАЛИЗА ЦЕЛЬНОЙ РАЗВЕДЕННОЙ КРОВИ

**Цель занятия:** изучение кинетики спонтанной и стимулированной люминолзависимой хемилюминесценции цельной разведенной крови.

**Материалы и оборудование:** хемилюминометр, шприц 10 мл, Гепаринизированная кровь, физиологический раствор Хенкса, люминол, змиозан, кюветы для хемилюминесцентного анализа.

**Вопросы для самоподготовки:**

1. Клеточный иммунный ответ.
2. Фагоцитоз.
3. Активные формы кислорода, их образование в клетках.
4. Медицинское применение люминесцентных методов исследования.

### ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Фагоциты осуществляют клеточный иммунный ответ, являющийся частью врожденного иммунитета. При фагоцитозе частица заключается в фагосому, которая транспортирует её к лизосоме. При слиянии фагосомы и лизосомы образуется фаголизосома, где и происходит разрушение патогена. Процесс фагоцитоза сопровождается кислородным взрывом, возникающим в результате активации связанного с G-белком рецептора на поверхности мембраны иммунной клетки и последующего запуска сигнального каскада, заканчивающегося образованием активных форм кислорода (АФК). В образовании АФК фагоцитами принимают участие ферменты миелопероксидаза и никотинамидадениндинуклеотид фосфат (НАДФН) оксидаза. При этом образуются супероксид анион радикал, перекись водорода, синглетный кислород, гипохлорит и активные радикалы гидроксила. АФК выделяются в окружающую среду или в субклеточные мембранные органеллы. АФК, образующиеся в результате кислородного

взрыва, находятся в возбужденном состоянии, возвращение на основной энергетический уровень сопровождается испусканием фотонов.

При различных воспалительных заболеваниях продукция АФК фагоцитами резко повышается, что приводит к усилению хемилюминесцентного сигнала. Таким образом, для оценки функциональной активности фагоцитов может быть использован хемилюминесцентный анализ. При этом для усиления хемилюминесцентного сигнала могут быть использованы люминол или люцигенин. Усиление хемилюминесценции люминолом в основном обусловлено активностью миелопероксидазы, тогда как усиление хемилюминесценции люцигенином связано с активностью НАДФН оксидазы. Кислородный взрыв индуцируют зимозаном. Зимозан получают из клеточных стенок дрожжевых клеток. Зимозан состоит из полисахаридов  $\beta$ -глюкана и маннана, белков, липидов. Зимозан активирует образование воспалительных медиаторов, действуя через рецептор к  $\beta$ -глюкану dectin-1 и рецептор TLR2.

Хемилюминесцентный анализ является основным в оценке функциональной активности фагоцитов. Для скрининга больных с дефектами фагоцитарного звена используют микрометод анализа хемилюминесценции (ХЛ) в цельной крови, в которой помимо нейтрофилов присутствуют эритроциты, моноциты и тромбоциты, не вносящие при соответствующем разведении существенного вклада в конечный показатель ХЛ. Исследование, проводимое на цельной крови, может отражать физиологическое состояние организма лучше, чем исследование, проводимое на изолированных клетках, так как процесс изолирования нарушает жизнеспособность, активность клеток и экспрессию рецепторов на их поверхности. Для проведения хемилюминесцентного анализа требуется небольшой объем крови (1–50 мл), что является преимуществом метода и позволяет использовать его в экспериментах на животных, когда забор большого объема крови невозможен.

По методике, предложенной Земсковым В.М. (1988) в модификации Аверченкова В.М. (2001), измерение стимулированной люминолзависимой хемилюминесценции (ЛХЛ) цельной разведенной крови проводится в течение 30 минут. Анализу подлежит время появления максимума ХЛ (респираторного взрыва) и количество импульсов генерируемых одной клеткой (нейтрофильным гранулоцитом периферической крови), поглотившей зимозан, за 1 минуту (импульс/клетка за минуту).

При выборе продолжительности регистрации ЛХЛ необходимо учитывать, что между моментом связывания объекта фагоцитоза и началом образования активных радикалов имеется лаг-период 16–60 секунд и более, в зависимости от вида стимулятора. Скорость образования радикалов начинает снижаться через 20–30 минут после старта активации и через 60 минут становится в несколько раз ниже начальной скорости. ЛХЛ цельной крови можно наблюдать в течение 10–12 часов, причем разведение её физиологическим раствором или раствором Хенкса увеличивало интенсивность ХЛ.

При вторичной стимуляции получить повторный респираторный взрыв не удастся. Это связано с тем, что респираторный взрыв и образование активных радикалов не сопровождается стимуляцией синтеза белка в клетке из-за отсутствия эндоплазматической сети в нейтрофилах. Поэтому респираторный взрыв может быть спровоцирован в этой клетке однократно.

## ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

1. Получить кровь от лабораторной крысы Wistar и поместить её в центрифужную пробирку с гепарином (5 ЕД/мл).
2. 80 мкл гепаринизированной крови развести в 600 мкл полного раствора Хенкса без красителей. В 2 кюветы для хемилюминесцентного анализа поместить по 200 мкл полученного раствора.
3. В одну из кювет с разведенной кровью добавить 100 мкл люминола ( $5,6 \times 10^{-4}$  М) и 100 мкл зимозана (20 мг/мл) для изучения стимулированной ЛХЛ.
4. Во вторую кювету добавить 100 мкл люминола ( $5,6 \times 10^{-4}$  М) для регистрации спонтанной ЛХЛ (не добавлять зимозан!).
5. Регистрировать стимулированную и спонтанную ЛХЛ в течение 2 часов, каждые 30 секунд одновременно в разных кюветах при температуре инкубации 37 °С.
6. Оценить время появления пика и интенсивность его ХЛ (выражали в условных единицах), для чего из регистрируемого значения интенсивности светосуммы максимума ХЛ вычесть фоновое свечение хемилюминометра.



### **Вопросы для самоконтроля:**

1. С какой целью проводят хемилюминесцентный анализ крови?
2. Каким образом можно оценить функциональную активность фагоцитов хемилюминесцентным методом?

### **ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ**

*Выберите один или несколько правильных вариантов ответов.*

1. К КЛЕТКАМ КРОВИ, НЕ ОСУЩЕСТВЛЯЮЩИМ ФАГОЦИТОЗ, ОТНОСЯТСЯ

- 1) эозинофилы
- 2) нейтрофилы
- 3) тромбоциты
- 4) моноциты

2. К ГРУППЕ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА НЕ ОТНОСИТСЯ

- 1) перекись водорода
- 2) гипохлорит-ион
- 3) синглетный кислород
- 4) хлорид-ион

3. ЛЮМИНОЛ УСИЛИВАЕТ ХЕМИЛЮМИНИСЦЕНЦИЮ В РЕАКЦИЯХ ОБРАЗОВАНИЯ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА ФАГОЦИТАМИ, ОПОСРЕДОВАННЫХ

- 1) миелопероксидазой
- 2) НАДФН оксидазой
- 3) каталазой
- 4) супероксиддисмутазой

4. К ФЕРМЕНТАМ, УЧАСТВУЮЩИМ В ОБРАЗОВАНИИ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА, НЕ ОТНОСИТСЯ

- 1) миелопероксидаза
- 2) НАДФН оксидаза
- 3) каталаза
- 4) NO-синтаза

5. ДЛЯ УСИЛЕНИЯ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ, ОБУСЛОВЛЕННОЙ ОБРАЗОВАНИЕМ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА ФАГОЦИТАМИ, ИСПОЛЬЗУЮТ

- 1) зимозан
- 2) люминол
- 3)  $\text{FeSO}_4$
- 4)  $\alpha$ -нафтол

6. ПРИ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНОМ АНАЛИЗЕ К ОБРАЗЦУ ЦЕЛЬНОЙ КРОВИ ДОБАВЛЯЮТ ЗИМОЗАН ДЛЯ

- 1) активации образования активных форм кислорода в фагоцитах
- 2) усиления хемилюминесцентного сигнала
- 3) ингибирования свертывающей системы крови
- 4) тушения хемилюминесценции

## СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ

### Задача 1

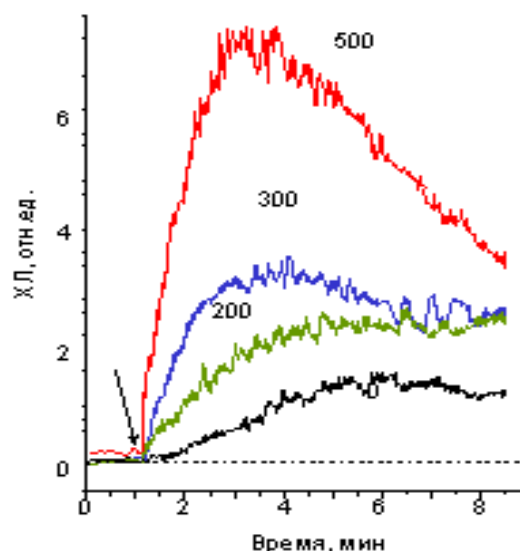
Исследовали хемилюминисценцию фагоцитов при воспалительном процессе и при длительном недостатке кислорода. В обоих случаях для усиления люминисцентного сигнала использовали люминол. В каком случае интенсивность хемилюминисценции будет выше? Объясните ответ.

*Как изменится интенсивность хемилюминесценции фагоцитов, стимулированной люминолом, в случае воспалительного процесса и при длительном недостатке кислорода?*

### Задача 2

На рисунке 13 показана хемилюминесценция клеток крови при действии на кровь кратковременных электрических импульсов в присутствии люминола. Чем обусловлено увеличение интенсивности хемилюминисценции при росте напряжения электрического тока?

*Объясните полученные результаты.*

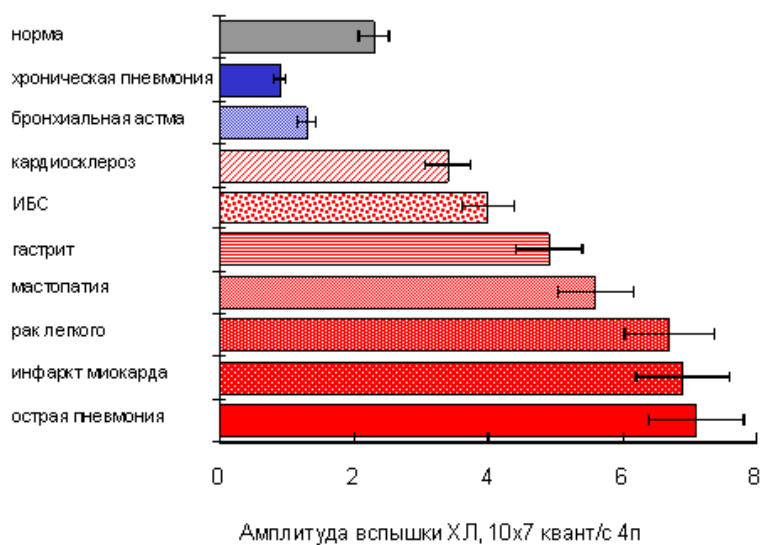


**Рис. 13.** Хемилюминесценция клеток крови в присутствии люминола при стимуляции электрическими импульсами разного напряжения (показано цифрами над кривыми, вольты)

### Задача 3

При исследовании хемилюминесценции изолированных лейкоцитов крови больных с различными заболеваниями были получены результаты, представленные на диаграмме ниже.

*Объясните наблюдаемые изменения интенсивности хемилюминесценции лейкоцитов, стимулированных частицами латекса, при различных заболеваниях по сравнению с нормой.*



**Рис. 14.** Амплитуда хемилюминесцентных ответов изолированных лейкоцитов крови, полученной от больных различными заболеваниями. Стимулирование клеток осуществляли частичками латекса.

# ЭТАЛОНЫ ОТВЕТОВ К ТЕСТОВЫМ ЗАДАНИЯМ

## ЗАНЯТИЕ 1

### ИЗМЕРЕНИЕ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ ТКАНЕЙ РАСТЕНИЙ

№ задания	№ ответа	№ задания	№ ответа
1.	4	4.	4
2.	2	5.	2
3.	2	6.	1

## ЗАНЯТИЕ 2

### ИЗМЕРЕНИЕ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ ЛИПОПРОТЕИДОВ, ИНДУЦИРОВАННОЙ ИОНАМИ Fe<sup>2+</sup>

№ задания	№ ответа	№ задания	№ ответа
1.	1	4.	2
2.	4	5.	3
3.	1, 3	6.	4

## ЗАНЯТИЕ 3

### ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОДУКЦИИ ПЕРЕКИСИ ВОДОРОДА В КЛЕТКАХ МЕТОДОМ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО АНАЛИЗА

№ задания	№ ответа	№ задания	№ ответа
1.	1	4.	2
2.	2	5.	1
3.	1	6.	2

## ЗАНЯТИЕ 4

### ПРОВЕДЕНИЕ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО АНАЛИЗА ЦЕЛЬНОЙ РАЗВЕДЕННОЙ КРОВИ

№ задания	№ ответа	№ задания	№ ответа
1.	3	4.	3
2.	4	5.	2
3.	1	6.	1

# ОТВЕТЫ К СИТУАЦИОННЫМ ЗАДАЧАМ

## ЗАНЯТИЕ 1

### ИЗМЕРЕНИЕ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ ТКАНЕЙ РАСТЕНИЙ

#### Задача 1

Каталаза – фермент, разлагающий перекись водорода, которая, вступая в реакцию с люминолом, обуславливает появление хемилюминесцентного ответа. Следовательно, ингибирование каталазы приведёт к увеличению концентрации перекиси водорода и усилению интенсивности вспышки хемилюминесценции.

#### Задача 2

Люминол усиливает хемилюминесценцию, обусловленную активными формами кислорода. Окисление люминола под действием активных форм кислорода (радикал гидроксила, перекись водорода) образует радикал люминола, который затем вступает в реакцию с супероксидным радикалом, образуя внутреннюю перекись (диоксид). Ее разложение приводит к образованию возбужденной молекулы 3-аминофталаата, переход которой в основное состояние сопровождается испусканием кванта света.

#### Задача 3

Пероксидаза катализирует реакцию  $H_2O_2$  и липидов с образованием диокситанов, которые спонтанно излучают свет. Ингибирование пероксидазы тормозит реакцию и снижает квантовый выход хемилюминесценции.

## ЗАНЯТИЕ 2

### ИЗМЕРЕНИЕ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ ЛИПОПРОТЕИДОВ, ИНДУЦИРОВАННОЙ ИОНАМИ $Fe^{2+}$

#### Задача 1

Лечение Уф-ОК не эффективно.

## **Задача 2**

Ключевой реакцией возбуждения хемилюминесценции люминола является взаимодействие с гидроксильным радикалом, в то время как реакция люминола с липидными радикалами не приводит к люминол-зависимой люминесценции. Поэтому использование люминола для изучения перекисного окисления липидов нецелесообразно.

## **Задача 3**

При первом добавлении ионов  $Fe^{2+}$  медленное усиление свечения свидетельствует о невысокой скорости образования свободных радикалов. По мере окисления ионов  $Fe^{2+}$  скорость образования радикалов увеличивается и происходит взрывообразное усиление хемилюминесценции («медленная вспышка»). Снижение концентрации ионов  $Fe^{2+}$  приводит к снижению образования свободных радикалов в ходе реакции 4 (табл. 1) и, как следствие, к снижению интенсивности хемилюминесценции в конце «медленной вспышки» и появлению «стационарного свечения». При повторном добавлении  $Fe^{2+}$  к суспензии митохондрий возникновение «быстрой вспышки» хемилюминесценции можно объяснить накоплением большого количества гидроперекиси липида в ходе предыдущего процесса окисления. Высокая концентрация гидроперекисей и ионов  $Fe^{2+}$  приводит к быстрому появлению свободных радикалов в результате протекания реакции 4.

## **ЗАНЯТИЕ 3**

### **ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОДУКЦИИ ПЕРЕКИСИ ВОДОРОДА В КЛЕТКАХ МЕТОДОМ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО АНАЛИЗА**

#### **Задача 1**

При добавлении к раневому экссудату перекиси водорода с люминолом наблюдается хемилюминесценция, интенсивность которой прямо пропорциональна концентрации радикалов, образующихся при разложении перекиси водорода. По мере заживления раны количество свободных радикалов кислорода уменьшается, следовательно, уменьшается интенсивность хемилюминесценции.

#### **Задача 2**

Перекись водорода участвует в реакциях, сопровождающихся хемилюминесценцией. Каталаза разлагает перекись водорода до воды

и молекулярного кислорода ( $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ ), тем самым снижая концентрацию  $\text{H}_2\text{O}_2$  и интенсивность хемилюминесценции.

### **Задача 3**

Миоглобин – гем-содержащий белок. В присутствии ионов металлов переменной валентности, таких как железо, а также некоторых комплексов, например, производных гема, перекись водорода разлагается с образованием радикалов (гидроксила и супероксида). При взаимодействии радикалов с люминолом происходит выделение квантов света.

## **ЗАНЯТИЕ 4**

### **ПРОВЕДЕНИЕ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО АНАЛИЗА ЦЕЛЬНОЙ РАЗВЕДЕННОЙ КРОВИ**

#### **Задача 1**

При возникновении в организме очагов воспаления функциональная активность фагоцитов усиливается, что сопровождается повышением продукции АФК и усилением хемилюминесценции, вызванной люминолом. При длительном недостатке кислорода, связанном с общим ослаблением организма, активность фагоцитов и интенсивность хемилюминесценции снижаются.

#### **Задача 2**

Воздействие на клетки электрических импульсов увеличивает проницаемость клеточных мембран и стимулирует выделение клетками активных форм кислорода тем интенсивнее, чем выше напряжение электрических импульсов.

#### **Задача 3**

Заболевания, сопровождающиеся появлением очагов воспаления и распада тканей, характеризуются повышением функциональной активности лейкоцитов и повышением продукции АФК, что сопровождается усилением хемилюминесценции. Чем интенсивнее воспалительный процесс, тем выше интенсивность хемилюминесценции. При хронических заболеваниях, сопровождающихся длительной гипоксией, активность лейкоцитов, продукция АФК и интенсивность хемилюминесценции снижаются.

## РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

### ОСНОВНАЯ

1. Антонов, В.Ф. Физика и биофизика [Текст]: курс лекций для студентов медицинских вузов: учебное пособие / В.Ф. Антонов, А.В. Коржуев. – 3-е изд., перераб. и доп. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2006. – 240 с.
2. Волькенштейн, М.В. Биофизика [Электронный ресурс]: учебное пособие / М.В. Волькенштейн. – 4-е изд., стер. – СПб.: Лань, 2012. – 608 с. Режим доступа: <https://e.lanbook.com/book/3898>
3. Лекции по биофизике [Текст]: учебное пособие для студентов / М.Б. Баскаков [и др.] – Томск: Сибирский государственный медицинский университет, 2009. – 200 с.
4. Самойлов, В.О. Медицинская биофизика [Электронный ресурс]: учебник для вузов / В.О. Самойлов. – 3-е изд., испр. и доп. – СПб.: СпецЛит, 2013. – 591 с. Режим доступа: <https://e.lanbook.com/book/59853>

### ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ

1. Гришаева, Т.И. Методы люминесцентного анализа [Текст]: учебное пособие для вузов / Т.И. Гришаева. – СПб: АНО НПО «Профессионал», 2003. – 226 с.
2. Журавлев, А.И. Квантовая биофизика животных и человека [Текст]: учебное пособие / А.И. Журавлев. – 4-е изд., перераб. и доп. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2011. – 398 с.
3. Рощупкин, Д.И. Основы фотобиофизики [Текст]: учебное пособие / Д.И. Рощупкин, В.Г. Артюхов – Воронеж: ВГУ, 1997. – 116 с.
5. Фотобиофизика [Электронный ресурс]: учеб. пособие / И.Е. Суковатая [и др.] – Красноярск: ИПК СФУ, 2008. – 438 с. Режим доступа: [http://files.lib.sfu-kras.ru/ebibl/umkd/141/u\\_course.pdf](http://files.lib.sfu-kras.ru/ebibl/umkd/141/u_course.pdf)



Учебно-практическое издание

**Авторы:**

Людмила Вячеславовна Смаглий, Светлана Валерьевна Гусакова,  
Ирина Викторовна Петрова, Игорь Викторович Ковалев,  
Юлия Георгиевна Бирулина, Виктория Сергеевна Рыдченко,  
Алексей Валерьевич Носарев

**Руководство  
к практическим занятиям  
по общей биофизике: хемилюминометрия**

Учебное пособие

Редактор Е.В. Антошина  
Технический редактор О.В. Коломийцева  
Обложка Е.М. Харитонова

Издательство СибГМУ  
634050, г. Томск, пр. Ленина, 107  
тел. 8(382-2) 51-41-53  
E-mail: otd.redaktor@ssmu.ru

---

Подписано в печать 15.03.2019.  
Формат 60x84  $\frac{1}{16}$ . Бумага офсетная.  
Печать цифровая. Гарнитура «Times». Печ. л. 3,6. Авт. л. 2.  
Тираж 50 экз. Заказ № 13

---

Отпечатано в Издательстве СибГМУ  
634050, Томск, ул. Московский тракт, 2  
E-mail: lab.poligrafii@ssmu.ru