

УДК 577.3: 535.379

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ СВЕРХСЛАБОГО СВЕЧЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ. III. ФИЗИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

© 2022 г. Е.В. Наумова*, Ю.А. Владимиров**, В.В. Тучин***, ****, *****
В.А. Намиот**, И.В. Володяев**

*Институт физики полупроводников им. А.В. Ржанова СО РАН,
630090, Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 13

**Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1

***Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского,
410012, Саратов, ул. Астраханская, 83

****Национальный исследовательский Томский государственный университет, 634050, Томск, просп. Ленина, 36

*****Институт проблем точной механики и управления РАН – обособленное подразделение ФИЦ «Саратовский
научный центр РАН», 410028, Саратов, ул. Рабочая, 24

*****Институт биохимии им. А.Н. Баха ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН,
119071, Москва, Ленинский проспект, 33/2

E-mail: naumova@yandex.ru

Поступила в редакцию 23.08.2021 г.

После доработки 25.10.2021 г.

Принята к публикации 27.10.2021 г.

Статья является третьей, завершающей частью обзора методов исследования сверхслабого свечения биологических объектов. В первой части были рассмотрены общие вопросы (история исследований, основная терминология и т.п.), во второй представлен анализ методик биологического детектирования. Третья часть обзора посвящена физическим методам исследований сверхслабого свечения биологических объектов: кратко описаны основные устройства и принципы детектирования, а также способы повышения соотношения сигнал/шум, приведены схемы ряда установок и особенности различных методов исследования с примерами результатов, рассмотрены перспективы дальнейшего развития техники и направлений исследований сверхслабого свечения биологических объектов.

Ключевые слова: сверхслабое свечение биологических объектов, хемилюминесценция, техника регистрации сверхслабых излучений в оптическом диапазоне, спектральный анализ, биофотоника, фотоэлектронные умножители, CCD-камеры.

DOI: 10.31857/S0006302922010057

Сверхслабое свечение (ССС) биологических объектов было обнаружено А.Г. Гурвичем благодаря стимулирующему воздействию его ультрафиолетовой (УФ) компоненты на деление клеток. Первые годы для детектирования этой компоненты, получившей название митогенетического излучения, использовали только биологические объекты. Использование в качестве детекторов биологических объектов имело целый ряд недостатков: оно было чрезвычайно трудоемким и длительным, требовало очень тщательного соблюдения методики; чтобы преодолеть проблемы

естественной вариабельности биологических детекторов, необходимо было многократно повторять эксперименты, причем в каждой серии индивидуально подбирать продолжительность экспонирования; биологические детекторы не позволяли оценить интенсивность излучения. Подробнее проблемы методик биологического детектирования, в том числе их недостаточная воспроизводимость и доказательность, были рассмотрены в ч. 2 настоящего обзора [1].

В первые годы после открытия А.Г. Гурвича начались активные попытки зарегистрировать сверхслабое свечение биологических объектов без применения биологических детекторов – физическими и физико-химическими методами. Ряд предложенных методов – по нарушению формирования колец Лизеганга [2–4], по изменению скорости флокуляции [5, 6], разложения пе-

Сокращения: СССР – сверхслабое свечение, УФ – ультрафиолетовый, ФЭУ – фотоэлектронный умножитель, ИК – инфракрасный, АФК – активные формы кислорода, МКП – микроканальные пластины, ОПА – оптические просветляющие агенты, ОПТ – оптическое просветление ткани, ПП – показатель преломления.

рекиси водорода [4, 7] — обладали теми же недостатками, в первую очередь, чувствительностью к многочисленным факторам, которые невозможно было нормировать или устранить. Чувствительность фотографических методов в 1920–1930-х гг. также была недостаточной для регистрации излучения столь низкой интенсивности [8, 9], даже при экспонировании в течение нескольких суток [10].

Первыми физическими приборами, с помощью которых было зарегистрировано ССС биологических объектов, стали модифицированные счетчики Гейгера–Мюллера [11–14] (см. ниже раздел «Исследование ультрафиолетовой компоненты сверхслабого свечения с помощью модифицированных счетчиков Гейгера-Мюллера»), с их помощью было обнаружено также ССС ряда модельных химических систем [15], причем исследования проводились только в среднем УФ-диапазоне, в соответствии с чувствительностью используемых фотокатодов.

По ряду причин, во многом историко-политического характера (подробнее см. ч. 1 данного обзора [16], а также обзоры [17–20]) работы по исследованию митогенетического излучения полностью прекратились в Европе и США с началом Второй мировой войны, а в СССР были закрыты после августовской сессии ВАСХНИЛ 1948 г.

В середине 1950-х годов явление сверхслабого свечения биологических объектов было «переоткрыто» с помощью фотоэлектронных умножителей (ФЭУ) [21, 22], и далее почти все работы в этом направлении были посвящены ССС в диапазоне 370–1270 нм, т.е. в области видимого, ближнего инфракрасного (ИК) и ближнего ультрафиолетового диапазонов, где по сравнению со средним УФ-диапазоном одновременно выше интенсивность ССС биообъектов и модельных химических систем, прозрачность биологических сред и чувствительность большинства используемых детекторов (см. обзоры [23–27]).

Практически все технические устройства, которые применялись и применяются в настоящее время для регистрации ССС, основаны на использовании внешнего фотоэффекта (например, газоразрядные счетчики и ФЭУ) или внутреннего фотоэффекта (например, CCD-камеры (CCD — charge-coupled device), однофотонные лавинные фотодиоды). Каждый такой прибор обеспечивает *фотоэлектрическое преобразование*, т.е. образование носителей электрического заряда за счет энергии поглощенных фотонов, *усиление потока зарядов или их длительное накопление*, и *регистрацию* с помощью электронных схем, которая часто сопровождается обработкой, направленной на подавление шумов. Усиление или длительное накопление необходимо, чтобы получить достаточный для регистрации поток электронов, поскольку

ку поглощение фотона вызывает генерацию не более чем одного фотоэлектрона. Например, в ФЭУ лавина на выходе фотоумножительного блока, созданная одним фотоэлектроном, составляет 10^6 – 10^9 электронов.

Наиболее важно при регистрации сверхслабых излучений соотношение «сигнал/шум». Эффективность фотоэлектрического преобразования характеризуется квантовым выходом, т.е. средним количеством эмитируемых фотоэлектронов на падающий фотон. Квантовый выход представляет собой произведение коэффициента поглощения фотонов и коэффициента, характеризующего количество фотоэлектронов, эмитируемых при поглощении фотона. Максимальный квантовый выход современных ФЭУ, т.е. квантовый выход на длине волны, соответствующей максимальной чувствительности, достигает для некоторых материалов фотокатодов 50%, у твердотельных устройств максимальный квантовый выход выше. Например, для CCD- и EMCCD-камер он достигает значений более 90%. Близкой характеристикой является спектральная чувствительность, выражаемая в мА/Вт, которая показывает отношение регистрируемого тока к мощности падающего излучения в зависимости от длины волны. Темновой ток (темновой счет), который показывает интенсивность потока электронов, регистрируемого в отсутствие освещения, обусловлен в основном тепловой генерацией носителей заряда (которую можно снизить на несколько порядков за счет охлаждения), а также наличием радиации, космических излучений и т.п. В CCD-матрицах существенное значение имеют еще шумы считывания (их снижение за счет аппаратного и программного биннинга будет описано в разделе «Системы 2D-изображения сверхслабых свечений»). Шумы, возникающие при умножении электронного потока в ФЭУ, т.е. как колебания коэффициента усиления полезного сигнала, так и импульсы, порождаемые лавинами, образовавшимися за счет термоэлектронов, эмитированных в блоке усиления, в режиме счета фотонов достаточно эффективно можно убрать на аппаратном уровне. Кроме того, само ССС имеет естественные флуктуации, так называемый дробовой шум, и аналогичный шум возникает за счет вероятностного характера процессов поглощения фотонов и генерации носителей заряда.

Устройства с внутренним фотоэффектом позволяют обеспечить более высокий квантовый выход, но обычно имеют более высокие собственные шумы, чем устройства с внешним фотоэффектом, например, для ФЭУ минимальный уровень темнового счета примерно на четыре порядка ниже, чем у однофотонных лавинных диодов при сравнимых температурах. Сами твердотельные детекторы с внутренним фотоэффектом

как правило компактнее и легче вакуумных электронных детекторов, т.е. устройств с внешним фотоэффектом; они не требуют источника высокого напряжения, но часто не менее громоздки за счет системы охлаждения.

В настоящее время наиболее распространенными устройствами для регистрации ССС биологических объектов без пространственного разрешения являются ФЭУ (см. раздел «Исследования сверхслабого свечения с помощью ФЭУ без пространственного и спектрального разрешения»), а для получения двумерных изображений — ССД-камеры, см. раздел «Получение изображений с помощью твердотельных устройств (ССД-камер)». Лавинные фотодиоды, работающие в режиме Гейгера (Geiger mode avalanche photo diode, GmAPD), иначе называемые однофотонными лавинными диодами (single photon avalanche diode, SPAD) [28], широко применяются в технике, но для исследования ССС биологических объектов они использовались очень редко [29–31]. Их преимуществами по сравнению с ФЭУ являются дешевизна и высокий квантовый выход (до 90%), а недостатками — существенно более высокие шумы на единицу площади фоточувствительной поверхности (обычно $>10^5$ квантов·см⁻²·с⁻¹) и малая, менее 1 мм², рабочая площадь (последнее является существенным недостатком в связи с проблемами фокусировки ССС и его низкой интенсивностью). Вместе с тем отдельные работы продемонстрировали приемлемый уровень соотношения сигнал/шум. Например, в работе [29] для регистрации ССС срезов мозга с помощью кремниевого лавинного диода диаметром 50 мкм использовали коническое оптоволокно с входным диаметром 975 мкм и выходным диаметром 50 мкм, что позволило многократно увеличить светосбор. При этом темновой счет и общий квантовый выход устройства при охлаждении жидким азотом (77 К) составили 0.08 счетов в секунду и 5%, соответственно заявленная чувствительность составляла порядка 10^{-19} Вт [29], а соотношение «сигнал/шум» — около 0.6. Устройства формирования изображений на основе массивов однофотонных лавинных диодов, которые уже нашли многочисленные применения в других областях биофотоники [32] (см. обзор по технике этих устройств [33], а также некоторые сравнения технических характеристик в работе [34]), насколько нам известно, пока не использовались для исследований ССС, основными причинами этого являются высокие шумы и относительно малый коэффициент заполнения поверхности. Также нам неизвестны работы, в которых для регистрации ССС используются гибридные устройства, т.е. сочетающие электронно-вакуумные и твердотельные элементы, например, гибридные фотодетекторы (hybrid photo-detectors,

HPD), в которых электроны, вылетевшие из фотокатода, разгоняются в вакууме сильным электрическим полем между фотокатодом и лавинным диодом и бомбардируют полупроводник, порождая лавину электронов за счет ударной ионизации [35].

В настоящее время для прикладных биомедицинских задач, не требующих спектрального и пространственного разрешения, для регистрации ССС обычно используют портативные хемиллюминометры с ФЭУ без охлаждения. Иногда для регистрации ССС биологических объектов применяют серийные устройства другого назначения, которые могут использоваться в режиме хемиллюминометра, например, жидкостные сцинтилляционные счетчики с ФЭУ [36]. Для исследовательских целей обычно используют специально сконструированные лабораторные установки.

Хотя светочувствительность современных фотоматериалов позволяет регистрировать сверхслабые излучения (см., например, убедительную серию работ по регистрации ССС биообъектов с помощью фотопленок, выполненную А.П. Бойченко [37–40], и рис. 13 в разделе «Системы 2D-изображения сверхслабых свечений»), фотографические методы не получили широкого распространения. В первую очередь это связано с проблемами количественной характеристики интенсивности излучения фотографическим методом.

СПЕЦИФИКА И ТЕХНИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ИССЛЕДОВАНИЙ СВЕРХСЛАБОГО СВЕЧЕНИЯ, КЛАССИФИКАЦИЯ МЕТОДИК

Специфика исследований ССС связана в первую очередь с низкой интенсивностью и рассеянным характером излучения, а также с необходимостью поддерживать исследуемые биообъекты в определенных физиологических условиях. Для повышения соотношения «сигнал/шум» используется как снижение шумов устройств регистрации излучения, так и повышение сигнала за счет эффективного светосбора, причем возможности фокусировки ограничены из-за рассеянного характера излучения.

Охлаждение детекторов. Основной причиной темновых шумов являются термоэмиссионные электроны, и для большинства используемых фоточувствительных материалов термоэмиссия резко уменьшается с понижением температуры. Охлаждение ФЭУ в некоторых отдельных работах проводили с помощью твердой углекислоты [21, 22, 41], но основная масса научных исследований ССС с помощью ФЭУ в первые десятилетия была выполнена с охлаждением жидким азотом [42], см. также обзоры [23–25]). Разработки в области фотокатодов привели к повышению соотношения сигнал/шум и обеспечили возможность при-

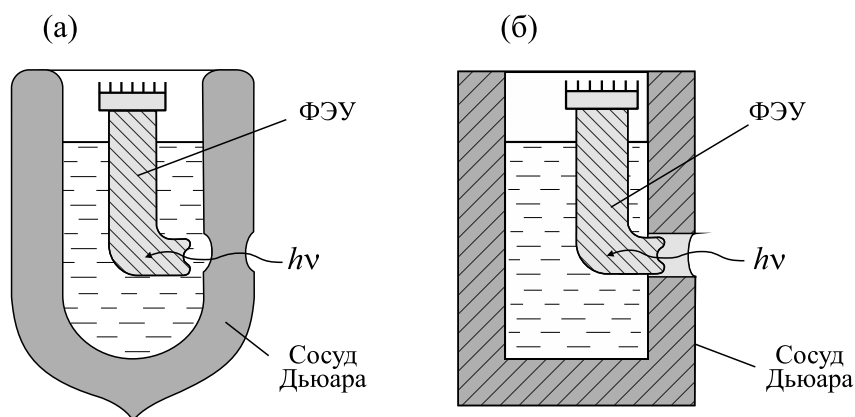


Рис. 1. Схемы установок для измерения CCC: (а) — установка групп Ю.А. Владимирова [50, 54] и Р.Ф. Васильева [55, 58]; (б) — установка группы Б.Н. Тарусова [56, 57]. (Из работы [59].)

менения ФЭУ с менее глубоким охлаждением (например, в конце 1960-х годов уже использовали ФЭУ с охлаждением проточной холодной водой, в настоящее время из компактных вариантов охлаждения обычно используются элементы Пельтье) и без охлаждения, что упростило эксперименты и уменьшило размеры установок, пригодных для решения большинства практических задач. В научных исследованиях, предъявляющих повышенные требования к соотношению «сигнал/шум», например, при спектральных исследованиях CCC, продолжает использоваться умеренное охлаждение ФЭУ; CCD-камеры, тепловые шумы у которых выше, практически всегда охлаждают до криогенных температур или близких к ним, обычно $-(100-120)^{\circ}\text{C}$ [43–47], интенсифицированные CCD-камеры (Intensified CCD-camera, ICCD) для получения изображений охлаждают до $-(45-50)^{\circ}\text{C}$ [48, 49].

При исследованиях CCC биологических объектов и модельных химических систем, как правило, требуется поддержание определенного температурного режима. Термостатирование биологических объектов в установках обычно предусматривается в пределах $0-50^{\circ}\text{C}$, при этом разница температур между охлаждаемым детектором и нагреваемым до физиологических температур образцом может составлять порядка 150 градусов. С учетом того, что образец и детектор желательно размещать на предельно близком расстоянии для максимального светосбора и разделять минимальным количеством поверхностей для снижения потерь на отражение, поддержание такой значительной разности температур и исключение конденсации на поверхностях, разделяющих образец и детектор, представляет собой непростую задачу.

Оптические схемы, режим освещения. ФЭУ обычно располагается под кюветой для образцов с плоским дном, перекрывающим всю рабочую

площадь окна. Такое расположение, во-первых, максимально снижает нагрев ФЭУ от кюветы, а во-вторых, обеспечивает максимальный светосбор при минимальном объеме исследуемого образца. Кроме того, используются схемы с боковым расположением кюветы и ФЭУ (см., например, работу [50] и рис. 1), в частности, такой выбор бывает связан с конструктивными особенностями системы охлаждения (например, сосуд Дьюара). Используются также и многокюветные схемы с автоматической сменой экспериментальных и контрольных образцов. При исследованиях биообъектов сложной геометрии (растений, животных, человека) их размещение относительно детектора в значительной мере определяется удобством доступа к исследуемой поверхности. Иногда используют световоды [51] или оптические волокна [52], и тогда расположение объекта относительно детектора не играет существенной роли. При этом, чтобы уменьшить количество границ отражения, иногда жидкие образцы располагают непосредственно на световоде, без кювет [53].

Важное значение оптического пропускания элементов, расположенных между источником и детектором, демонстрирует пример из ранней истории применения ФЭУ для исследований CCC. Переход от схемы, в которой ФЭУ размещался в сосуде Дьюара с жидким азотом, а излучение выходило через кварцевое окно напротив окна ФЭУ (рис. 1а) [50, 54, 55], к схеме на рис. 1б, когда ФЭУ размещался в пенопластовом термосе с жидким азотом, и отверстие в пенопласте плотно прилегло к входному окну ФЭУ [56, 57], позволило уменьшить светопотери за счет устранения двух стекол (стенки сосуда Дьюара) и слоя жидкого азота (между окном ФЭУ и окном в стенке сосуда Дьюара) и приблизить источник к детектору. Именно это простое техническое решение повысило чувствительность установок почти на два

порядка, что позволило зарегистрировать спонтанное ССС животных клеток и тканей и привело к началу масштабных исследований ССС. Обнаруженное прижизненное ССС поверхности органов — мозга, мышц и печени крыс и кроликов в диапазоне 360–1200 нм было значительно слабее по интенсивности (порядка $40\text{--}50$ квантов·см⁻²·с⁻¹), чем ССС исследованных ранее растительных объектов.

При исследованиях без временного и пространственного разрешения с помощью ФЭУ образец, как правило, размещают по возможности ближе к рабочей поверхности фотокатода для увеличения светосбора, а специальные оптические элементы не используют.

Повышенные требования к оптической системе предъявляются при исследованиях спектров (см. раздел «Спектральный анализ сверхслабых свечений») и при получении 2D-изображений ССС (раздел «Системы 2D-изображения сверхслабых свечений»). Для получения качественного изображения ССС требуются высокое пропускание и большая числовая апертура, поэтому оптическая часть разрабатывается специально, например, в группе Х. Инабы (H. Inaba) были разработаны три оптические системы, предназначенные для получения изображений объектов разных размеров, — от размера тела человека до соевого боба с увеличением 1/20, 1/3, и 1.0. Для повышения пропускания оптические системы проектируются с минимальным количеством элементов. Для повышения светосбора при работе с детекторами малой площади иногда используют конические световоды [29].

Следует отметить, что некоторым веществам, в частности некоторым стеклам, свойственна довольно продолжительная фосфоресценция, интенсивность которой может быть существенной в сравнении с ССС, поэтому необходимо избегать попадания на исследуемые объекты и содержимое камеры прямых солнечных лучей и яркого света. Проводить эксперименты желательно в тщательно затемненном помещении, кроме того, перед началом исследования необходимо измерять фон кюветы, который может быть достаточно значимым. Обычно перед началом измерений рекомендуется некоторое время выдерживать исследуемые объекты и кюветы в темноте, например, в закрытой камере измерительного прибора (рекомендуемое время составляет от нескольких [60] до 15 мин [61]), камера должна быть полностью светоизолированной. Следует учитывать, что световой режим может существенно влиять на само ССС, например, свечение в среднем УФ-диапазоне некоторых биообъектов [62, 63] и модельных биохимических систем [64] требует постоянного присутствия слабого видимого света, что значительно затрудняет измерения. В экспериментах, направленных на исследование ССС

после предварительного облучения светом (т.е. задержанной люминесценции) тоже требуется освещение образцов, часто это реализуют с помощью оптоволокну [51, 52] или световода [65]. Для освещения образцов используют широкополосный источник, например, ксеноновую лампу с фильтрами [65], фотодиоды или лазер [51, 52].

Классификация методик исследований. Методики исследования ССС биообъектов можно классифицировать по различным принципам:

- по использованию факторов, непосредственно влияющих на хемилюминесценцию (спонтанная — индуцированная — активированная/усиленная хемилюминесценция);

- по временному разрешению — исследования ССС в динамике и без (из исследований динамики ССС следует выделить исследования статистических особенностей распределения потока фотонов по времени, анализ шумовой компоненты ССС);

- по пространственному разрешению — с пространственным разрешением и без него;

- по типам биообъектов — *in vitro* и *in vivo*; жидкие среды (культуры клеток, физиологические жидкости), ткани, многоклеточные организмы;

- по цели: исследования свойств самого ССС, в том числе при различных состояниях биообъекта, либо применение анализа ССС как инструмента для характеристики состояния биологического объекта (например, определения функциональной активности нейтрофилов).

ИССЛЕДОВАНИЕ УЛЬТРАФИОЛЕТОВОЙ КОМПОНЕНТЫ СВЕРХСЛАБОГО СВЕЧЕНИЯ С ПОМОЩЬЮ МОДИФИЦИРОВАННЫХ СЧЕТЧИКОВ ГЕЙГЕРА–МЮЛЛЕРА

Первые применения модифицированных счетчиков Гейгера–Мюллера для регистрации сверхслабого свечения. Впервые зарегистрировать ССС с помощью физического устройства удалось Б. Раевскому [11] в 1930 г. Для этого он сконструировал УФ-чувствительную модификацию газоразрядного счетчика [66, 67] (рис. 2), разработанного Г. Гейгером и В. Мюллером [68, 69]. Катод счетчика представлял собой металлический цилиндр с прорезанным окошком, на внутреннюю поверхность цилиндра был нанесен фоточувствительный слой. В центре цилиндра размещали анод в виде тонкой проволоки, покрытой полупроводниковым слоем, соединенный с сопротивлением $\sim 10^{10}$ Ом. Разность потенциалов между катодом и анодом достигала 1.5 кВ. Вся конструкция размещалась в кварцевой колбе, заполненной инертным газом. Источник митогенетического излучения располагали снаружи колбы напротив окошка в катоде, так что излучение попадало через окошко на фоточувствительный слой. Квант света, попавший на фотослой, выби-

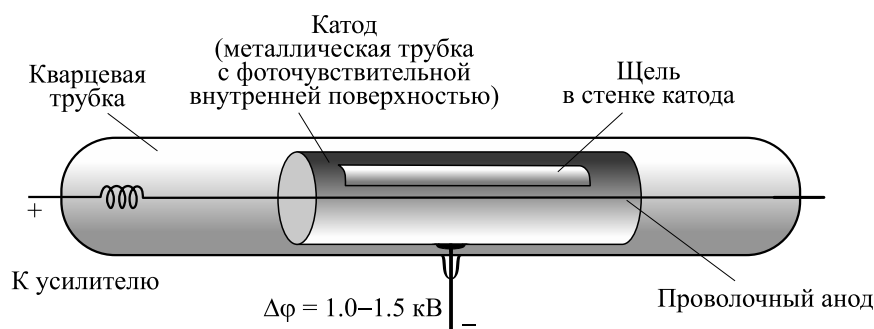


Рис. 2. Фоточувствительная модификация счетчика Гейгера–Мюллера, предложенная Б. Раевским [11, 66, 67]. (Из работы [70], с незначительными изменениями.)

вал из него электрон, который ускорялся электрическим полем и приводил к лавинообразной ионизации газа. Напряжение между анодом и катодом было меньше необходимого для дальнейшего самостоятельного поддержания разряда, накопление более медленных ионов экранировало анод и прерывало лавину. Электрический разряд регистрировался схемой с электрометром (в последующих аналогичных установках других авторов иногда использовались автоматические счетные устройства [12]).

Используя эту установку, автору удалось зарегистрировать излучение от корешка лука, кашицы лука и карциномы и оценить его интенсивность ~ 10 – 100 квантов в секунду [11].

Исследования сверхслабого свечения в период разработки и апробации различных модификаций счетчиков и методик измерения (1931–1935 гг.). Целый ряд подобных модификаций счетчиков Гейгера–Мюллера для исследований ССС был выполнен известными специалистами-физиками (Фр. Дессауэром [Fr. Dessauer] [71], В. Герлахом [W. Gerlach] [72], Г. Бартом [H. Barth] [73] и другими, см. табл. 1). Вместе с тем в течение первых пяти лет после работы Б. Раевского [67] УФ-чувствительные модификации счетчиков Гейгера–Мюллера были сами скорее предметом разработок, чем признанным измерительным инструментом: не только полученные результаты измерений, но оценки параметров счетчиков, подходы к их калибровке, и сама возможность применения счетчиков для детектирования митогенетического излучения ставились под сомнение. Количество положительных и отрицательных экспериментальных публикаций в этот период было сравнимо (см. табл. 1).

Ниже приведены основные причины неудач при попытках зарегистрировать ССС с помощью модифицированных счетчиков Гейгера–Мюллера (по работе [87]):

- неправильное положение катода, приводившее к помехам со стороны электростатических полей счетчика [88];

- недостаточный размер катода [86], или его неудачное положение [81], дающее малый светосбор и соответственно низкое соотношение сигнал/шум;

- потеря чувствительности фоточувствительного слоя [88];

- использование слишком большого сопротивления, которое приводило к токам утечки по поверхности счетчика [86];

- использование неизлучающих объектов [76, 84, 88].

Негативные экспериментальные работы выявили возможные источники систематических ошибок, например, в конструкции счетчика, использованного в работе [84] при приближении корня лука количество счетов возрастало на 50% из-за высокой чувствительности использованной конструкции к влажности. В позитивных работах был получен ряд важных технических решений. Например, была предложена разностная схема регистрации ССС [83, 89], в которой один счетчик измерял ССС объекта, а другой работал в темновом режиме, вычитание шумов, связанных с космическими излучениями и другими помехами, существенно повышало соотношение «сигнал/шум». Такая схема была использована более чем в 2000 успешных экспериментов по измерению ССС крови и мочи здоровых людей, крови онкобольных, крови кроликов и некоторых окислительных модельных систем (см. примеры результатов на рис. 3) [89, 90].

Общей проблемой и позитивных, и негативных работ первых пяти лет применения модифицированных счетчиков Гейгера–Мюллера для исследования ССС было отсутствие должной калибровки. Методы калибровки находились в процессе развития и отличались у разных авторов настолько, что сравнить чувствительности их приборов между собой по этим данным практически

Таблица 1. Эксперименты 1930–1935 гг. по детектированию митогенетического излучения с помощью модифицированных счетчиков Гейгера–Мюллера (из работы [74] с исправлениями и дополнениями)

Публикации	Фоточувствительная поверхность	Среднее число квантов на 1 регистрируемый счет	Калибровочная длина волны (нм)	Средства, используемые для калибровки	Исследуемые объекты	Результат	Оценка интенсивности, квантов·см ⁻² ·с ⁻¹
[11, 66, 67, 75]	Cd	10 ² –10 ³	265	Целлофановые фильтры	Корни лука Кашица из лука Карцинома Кашица из карциномы Яичный белок (термокоагуляция, расщепление кислотой и др.)	+	10–10 ²
[76]	K	>10 ⁴	366 266 254	Фотоэмульсии, скрещенные призмы Николя	Дрожжи	—	< 2000
[12, 77–79]	Al Cd	6·10 ³	253.7	Светопоглощающие растворы	Мышца лягушки Кашица из мышцы лягушки Сердце лягушки Химические/биохимические реакции	+	100–2000
[80]					Корни лука Бактерии	—	
[81]	Амальгама Zn	5·10 ² 10 ⁵	230 340	Калиброванная лампа на расстоянии 260 м	Кашица лука Корни лука Дрожжи	—	< 5
	Al	3·10 ³	230		Куриные эмбрионы	—	< 30
	Mg	5·10 ³	230		Злокачественные опухоли мышей	—	< 50
[82]	CuI, CuO, Cu ₂ O, Cu, Al	Нестабильно			Химические окислительные реакции	+	
[83]	Cd				Кровь Карциномы Моча Окислительные реакции	+	
[72]					K ₂ Cr ₂ O ₇ + FeSO ₄	+	
[84]	Pt	6·10 ³	250	Калиброванные щели	Яйца морского ежа Сперматозоид Дрожжи Окислительные процессы (кашица лука + H ₂ O ₂ , спирт + H ₂ O ₂ , бензальдегид + H ₂ O ₂ , эфир + H ₂ O ₂ , эфир + Br ₂ + воздух)	—	<50

Таблица 1. Окончание

Публикации	Фоточувствительная поверхность	Среднее число квантов на 1 регистрируемый счет	Калибровочная длина волны (нм)	Средства, используемые для калибровки	Исследуемые объекты	Результат	Оценка интенсивности, квантов·см ⁻² ·с ⁻¹
[85]	Cd	1400 2400	230 253.7	светофильтр (золь K ₂ Cr ₂ O ₇)	Кашица лука и корни Саркома мышцы Мышинные эмбрионы Мышцы лягушки	— — — —	<10–15
[73]	Al Cu CuI				K ₂ Cr ₂ O ₇ +FeSO ₄ Пищеварительные процессы	+ +	
[86]	Cd, Al Zn	(2–5)·10 ⁴	253.7	Фильтры из кварцевой муки, многократные отражения от гладких кварцевых поверхностей	Дрожжи Мышца лягушки	— —	<300

невозможно. Калибровку проводили на длинах волн, приближенных к длинноволновой границе спектра митогенетического излучения (см. табл. 1), это не позволяло даже грубо сравнить чувствительность счетчиков в спектральной области, на которую приходилась основная доля регистрируемого излучения. Фотокатоды, обладающие примерно одинаковой чувствительностью на калибровочных длинах волн, в середине спектрального диапазона митогенетического излуче-

ния отличались по чувствительности иногда на два порядка, см. нормированные спектральные характеристики фотокатодов из различных материалов на рис. 4 в следующем подразделе. Особенности конструкций УФ-чувствительных счетчиков, методы калибровки и их применения для исследований ССС биообъектов в 1930–1935 гг. наиболее подробно изложены в [78, 79], см. также обсуждение проблем калибровки в работах [74,

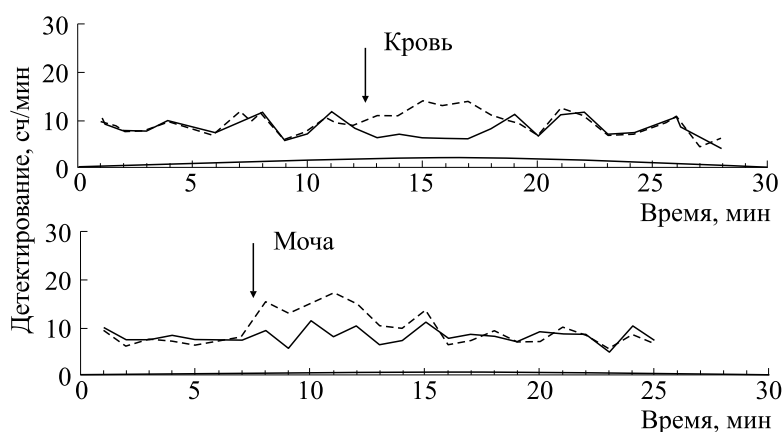


Рис. 3. Детектирование УФ-излучения с помощью разностной схемы с двумя модифицированными счетчиками Гейгера–Мюллера: сверху – кровь здорового человека, снизу – моча здорового человека; сплошная линия – контрольный счетчик (без образца), пунктирная линия – счетчик с образцом, стрелкой отмечено время внесения образца. (Из работы [89].)

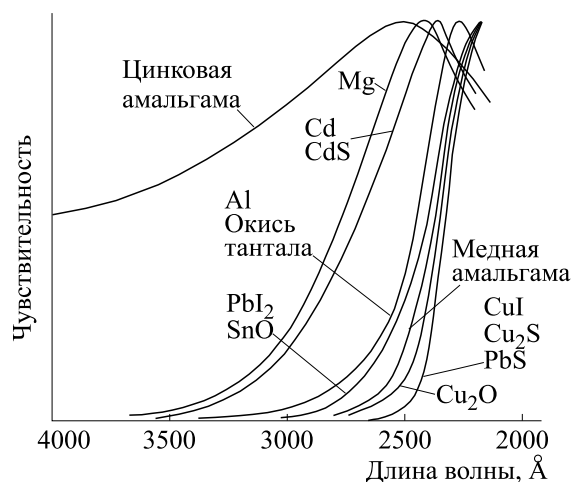


Рис. 4. Нормированные спектры чувствительности модифицированных счетчиков Гейгера–Мюллера с различными материалами фотокатода. (Из работы [15], с незначительными модификациями.)

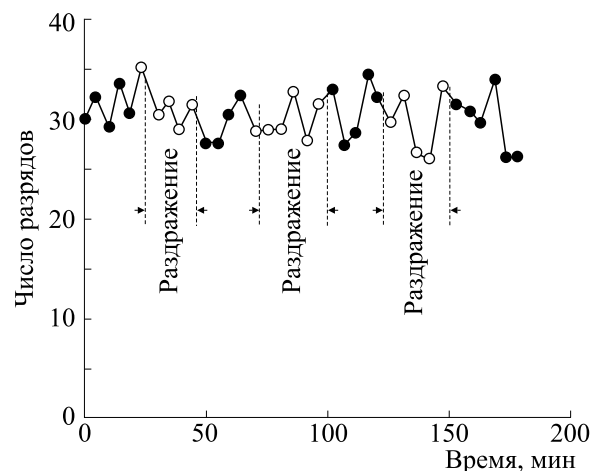


Рис. 6. Исследование сверхслабого свечения умерщвленного этанолом нерва лапы лягушки, периодически раздражаемого идентично нерву на рис. 5 (см. спектральную чувствительность использованного алюминиевого фотокатода на рис. 4). (Из работы [15], с незначительными модификациями.)

91] и некоторые технические параметры конкретных модификаций в работах [92–95].

Усовершенствование счетчиков и признание метода регистрации сверхслабых свечений с помощью модифицированных счетчиков Гейгера–Мюллера (1936–1939 гг.). Усовершенствование конструкций счетчиков — выбор фоточувствительных материалов и технологии их обработки, оптимизация геометрии электродов, подбор величины сопротивления, состава газа и других параметров счетчиков, а также развитие методов калибровки — позволили исследователям изготовить приборы, чувствительность которых к

слабому излучению нужного спектрального диапазона была в достаточной мере подтверждена (см. спектры чувствительности разных фоточувствительных материалов на рис. 4). С их помощью было убедительно продемонстрировано сверхслабое свечение от биологических объектов, индуцирующих митогенетический эффект, т.е. способных влиять на митотический режим других объектов (рис. 5), при этом излучение от объектов, не вызывающих митогенетический эффект, не регистрировалось (рис. 6).

В работах [14, 87, 96], было доказано существование излучения у всех исследованных индукторов митогенетического эффекта и приведены его свойства:

- интенсивность 10^1 – 10^3 квантов·см⁻²·с⁻¹;
- наличие ультрафиолетовой компоненты излучения в пределах области 190–280 нм;
- корреляция митогенетического излучения биообъектов (а также модельных систем) при биологическом и физическом детектировании.

После 1935 г. негативных экспериментальных работ по регистрации ССС модифицированными газоразрядными счетчиками, насколько нам известно, не было, только положительные (следует отметить, что эксперименты с модифицированными счетчиками Гейгера–Мюллера, описанные в негативной работе А. Холландера и В. Клауса 1937 года [91], были проведены в 1935 г.).

Значение модифицированных счетчиков Гейгера–Мюллера в исследованиях ССС.

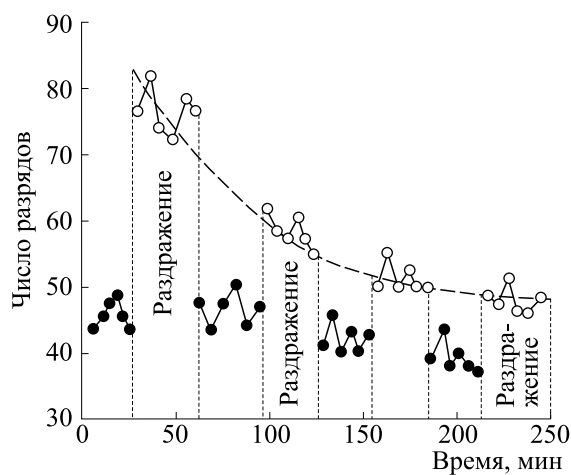


Рис. 5. Исследование сверхслабого свечения периодически раздражаемого нерва лапы лягушки (алюминиевый фотокатод, см. спектральную чувствительность на рис. 4). (Из работы [15], с незначительными модификациями.)

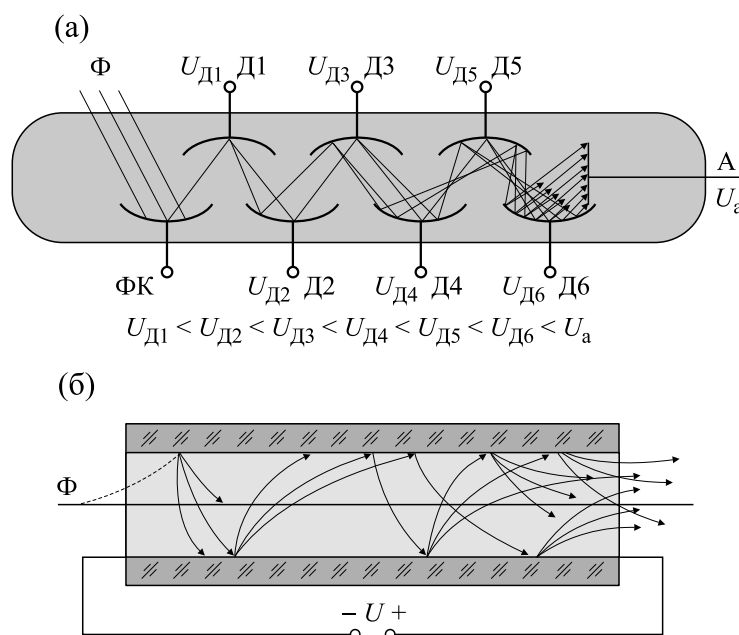


Рис. 7. Схема работы ФЭУ с различными вариантами электронного умножения: с системой динодов (а) и с канальным умножением (б). Фотоны Φ падают на фотокатод $\Phi К$ (а) или фоточувствительную стенку канала (б) и за счет внешнего фотоэффекта выбивают из него первичные электроны. Электроны разгоняются за счет разности потенциалов между динодами $Д$ (а) или вдоль стенок канала (б) и при каждом столкновении с поверхностью выбивают вторичные электроны, образуется лавина вторичных электронов, которая приходит на анод $А$ и создает электрический импульс. (Из работы [101] с незначительными изменениями.)

— Существование ССС было впервые подтверждено физическими методами, была оценена его интенсивность;

— обнаружена и исследована УФ-хемилюминесценция ряда химических реакций, оценены интенсивность и квантовый выход хемилюминесценции;

— выявлены основные проблемы физических исследований ССС, получен ряд технических решений.

См. также обсуждение исследований УФ-компоненты ССС с помощью модифицированных счетчиков Гейгера—Мюллера в негативных работах [74, 97] и в позитивных работах [64, 70, 87, 96].

ИССЛЕДОВАНИЯ СВЕРХСЛАБОГО СВЕЧЕНИЯ С ПОМОЩЬЮ ФЭУ БЕЗ ПРОСТРАНСТВЕННОГО И СПЕКТРАЛЬНОГО РАЗРЕШЕНИЯ

Изобретение и принцип работы ФЭУ. Первый ФЭУ был предложен и разработан А. Кубецким в 1930—1934 гг. (результаты были продемонстрированы в 1934 г., но работа опубликована значительно позднее [98]), вскоре была предложена система с рядом динодов [99] и затем практически современный вариант конструкции с электростатической фокусировкой [100]. В это время интерес к митогенетическому излучению был очень

высоким, предпринимались активные попытки применить к его исследованиям физические методы. Это широко обсуждалось на международном уровне и вряд ли прошло незамеченным для разработчиков и коллективов, работавших с ФЭУ. Вместе с тем, попыток применить ФЭУ для измерений ССС не было вплоть до середины 1950-х гг., в первую очередь это связано с высокими тепловыми шумами первых приборов, низким уровнем интенсивности излучения и использованием ФЭУ только в токовом режиме. После того как были разработаны схемы счета импульсов ФЭУ, т.е. появилась возможность счета отдельных фотонов, эти устройства начали применять для исследований ССС [21, 22, 42], что привело к стремительному развитию направления [23, 24]. В настоящее время при исследованиях ССС биологических объектов ФЭУ также используются только в режиме счета фотонов. Токковый режим работы ФЭУ, т.е. режим регистрации суммарного тока, при исследованиях ССС не используется.

Принцип работы ФЭУ поясняет рис. 7.

Наиболее важные характеристики ФЭУ (спектральная чувствительность, термоэмиссионные токи, т.е. основная составляющая шумов, и их зависимость от температуры) определяются материалом фотокатода. У современных ФЭУ квантовый выход составляет 15–50% в области максимальной спектральной чувствительности,

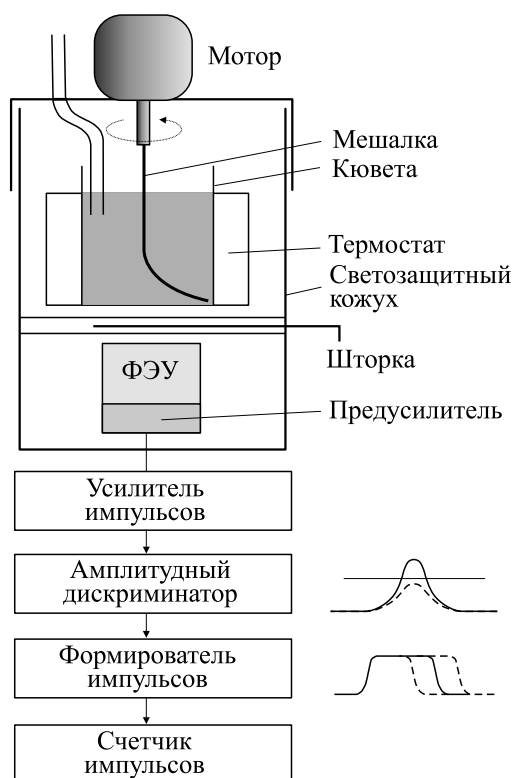


Рис. 8. Схема установки для измерения сверхслабого свечения жидких образцов.

темновой счет — 10^0 – 10^4 квантов (для регистрации ССС используются устройства с шумами <100 квантов·см $^{-2}$ ·с $^{-1}$), коэффициент умножения потока электронов 10^6 – 10^9 , временное разрешение от единиц наносекунд до десятков пикосекунд [35].

Базовая схема регистрации сверхслабых свечений с помощью ФЭУ без пространственного и спектрального разрешения. Почти все исследования ССС в диапазоне 370–1270 нм без пространственного и спектрального разрешения проводились с помощью ФЭУ. Стандартная схема установки для исследований ССС без пространственного и спектрального разрешения представлена на рис. 8: после ФЭУ последовательно располагаются усилитель (либо предусилитель и усилитель), дискриминатор для отсечки шумовых импульсов с амплитудой меньшей, чем у импульсов полезного сигнала, т.е. импульсов, обусловленных фотонами, формирователь импульсов для преобразования сигналов в прямоугольные импульсы одинаковой продолжительности, счетчик импульсов и компьютерный интерфейс. Минимальная продолжительность импульса от электронной лавины на выходе ФЭУ составляет порядка единиц наносекунд, и аналого-цифровое преобразование исходного сигнала ФЭУ с необходимой ча-

стотой >1 ГГц представляет технические сложности, более того, весь массив сырых данных имеет очень большой объем, что затрудняет обработку данных счета на значительном временном интервале, поэтому, несмотря на принципиальную возможность проведения аналого-цифрового преобразования сигнала непосредственно с ФЭУ, это на практике обычно не используется. Биологический объект и ФЭУ располагаются в отдельных светозащищенных отсеках, что обеспечивает возможность их термостатирования при существенно различающихся температурах.

При измерениях жидких образцов часто используются многокюветные схемы с автоматической сменой экспериментальных образцов и контролей. Для введения в исследуемую жидкую систему различных дополнительных веществ (инициаторов, активаторов, тушителей) в процессе измерений, в том числе для продувания ее газами, используются специальные инжекторы, которые подключают к дозаторам. В некоторых исследованиях в ходе эксперимента требуется также отбирать пробы для химического анализа, для этого служат пробоотборники. Довольно часто в экспериментах по исследованию ССС жидких биологических или химических систем необходимо перемешивание для обеспечения однородного состава исследуемой жидкой системы. В этом случае применяются специальные мешалки в виде лопаток с электроприводом, иногда для перемешивания используется встряхивание [102]. В современных системах для управления параметрами измерительной установки, смены образцов, дозированной дополнительной подачи веществ, температурой, скоростью перемешивания и т.п., а также синхронизации различных воздействий на образец с процессом измерений и вывода результатов используется компьютерный интерфейс.

Методы исследований сверхслабых свечений биообъектов с использованием химических и физических факторов. Обычно исследования спонтанного ССС используются для оценки каких-либо обобщенных характеристик физиологического или патологического состояния биообъекта, чаще всего для оценки характеристик клеток и тканей, связанных с окислительным (оксидативным) стрессом и защитой от него (см. ч. 1 данного обзора [16]). Спонтанное ССС несет информацию о сложном комплексе происходящих в биологическом объекте процессов, которая трудно поддается расшифровке. Поэтому для детального выяснения их механизмов часто используют модельные системы, имитирующие определенные этапы биологических процессов. Так, в работах по ССС, сопровождающему окисление углеводов [55, 58, 103–117], выяснены механизмы рекомбинации пероксирадикалов, приводящей к генерации электронно-возбужденных состояний.

Аналогичные процессы были показаны для жирных кислот и липидов [118–123].

Развернутую информацию дают исследования с использованием физических или химических факторов, селективно влияющих на определенные стадии процесса хемилюминесценции. Основная доля исследований как механизмов ССС биообъектов, так и прикладных применений исследований ССС связана с внесением в исследуемый материал дополнительных химических веществ – инициаторов, активаторов, тушителей и др. (см. раздел «Факторы, влияющие на хемилюминесценцию» в ч. 1 данного обзора [16]). Среди биологических материалов при этом наиболее широко исследуется кровь и ее компоненты [124–127].

Химические факторы. Инициаторы применяют практически при любых исследованиях биологического материала *in vitro* для запуска первой стадии свободно-радикальных процессов – инициации, т.е. усиленного образования в системе первичных свободных радикалов. В качестве инициаторов хемилюминесценции *in vitro* используются перекись водорода, ионы металлов переменной валентности, катализирующие одно-электронное восстановление кислорода (наиболее распространенный источник таких ионов – сульфат железа).

При наличии кислорода образовавшиеся в системе первичные свободные радикалы переходят в перекисные радикалы, рекомбинирующие с образованием квантов хемилюминесценции. При этом интенсивность и продолжительность вспышки такой хемилюминесценции определяется соотношением прооксидантов и антиоксидантов и характеризует, таким образом, процессы, протекающие в системе. В частности, методики с применением сульфата железа в качестве инициатора ССС плазмы крови были предложены в качестве дополнительных диагностических тестов различных заболеваний [128–130]. Для диагностических тестов используется в качестве инициатора и перекись водорода [125, 131–133], которая была одним из первых исследованных инициаторов ССС биообъектов [134] и используется в исследованиях ССС преимущественно в качестве источника гидроксильных радикалов ($\text{OH}^\bullet$).

Ценную информацию о хемилюминесценции биологических и модельных систем позволяет получить метод кинетической хемилюминесценции. Изменения интенсивности хемилюминесценции несут в себе существенную информацию о функциональном состоянии исследуемого объекта, но получить ее можно только путем математического анализа кинетики процесса с использованием математического моделирования. При этом на основании составленной модели хеми-

люминесцентного процесса рассчитывают кинетику концентрации участвующих веществ, константы скоростей реакций и корректируют представления о возможных схемах процессов.

Так, в классических работах по хемилюминесценции жирных кислот [121, 122, 135, 136], липидов микросом или митохондрий [23, 118, 121, 137–148], на основании подобных данных удалось выделить несколько стадий развития ССС, вне зависимости от индуцирующего агента [149]:

- спонтанное излучение,
- быстрая вспышка,
- стадия угнетения,
- латентный период,
- медленная вспышка,
- стационарный уровень.

Общепринятый в настоящее время вывод о том, что в липидном слое мембран митохондрий развивается реакция цепного окисления липидов с образованием гидропероксида цепей жирных кислот, причем ионы Fe^{2+} разветвляют цепи окисления липидов, делая процесс самоускоряющимся, был сделан на основании подобной сложной кривой ССС суспензии митохондрий после добавления к ней микромолярных количеств ионов Fe^{2+} , а также зависимостей накопления продукта реакции (малонового диальдегида) и окисления ионов железа (см. рис. 9) [149, 150]. Детальное математическое моделирование процесса [151] полностью подтвердило предполагаемый механизм протекающих процессов [149].

Наибольшее число работ по активированной хемилюминесценции крови и тканей посвящены исследованию функционального состояния фагоцитов, т.е. их способности выделять активные формы кислорода (АФК) для защиты организма от чужеродных агентов. В исследовательских целях выделение фагоцитами АФК стимулируют с помощью различных бактерий, химических веществ, электрических импульсов (рис. 10) и др.

Активность фагоцитов обычно усиливается при возникновении в организме очагов воспаления (например, после инфаркта миокарда) и в ряде других случаев. Наоборот, при длительном недостатке кислорода, связанном с общим ослаблением организма, активность фагоцитов и хемилюминесцентные ответы снижаются. На обширном материале была показана корреляция ССС лейкоцитов крови с наличием различных заболеваний (рис. 11).

Для активации используют как химические активаторы, например, люминол и люцигенин [153–155], так и физические активаторы, например, родамин Ж или производные кумаринов, прежде всего C-525 (см. обзоры [156, 157], а также описание и экспериментальное сравнение методик активированной хемилюминесценции крови

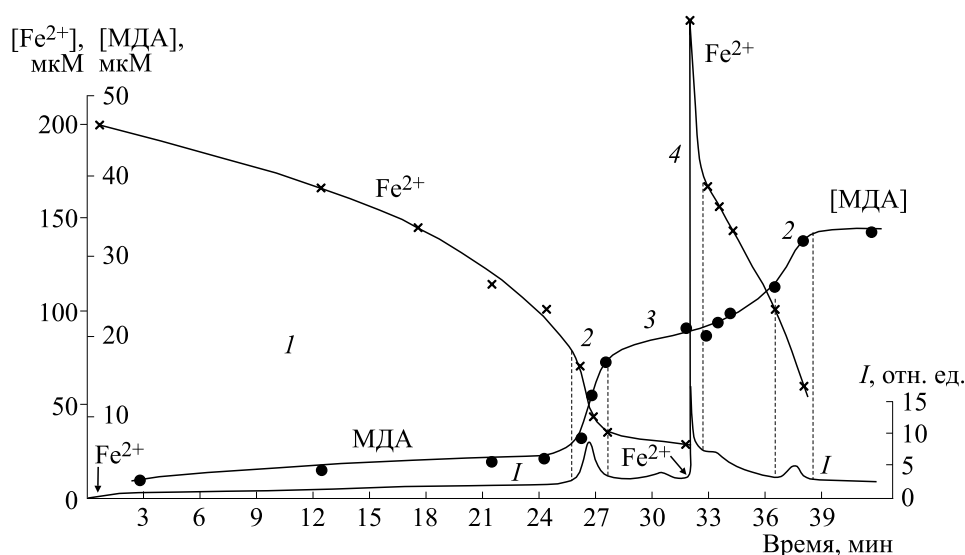


Рис. 9. Хемилюминесценция, изменение концентрации двухвалентного железа (Fe^{2+}) и малонового диальдегида (МДА) в суспензии митохондрий после добавления $0.2 \text{ мМ } \text{Fe}^{2+}$. Состав инкубационной смеси: 1 мл суспензии митохондрий в 10 мл 105 мМ NaCl и 20 мМ трис-буфера, pH 7.5; температура 20°C . 1–4 — стадии развития свечения: 1 — латентный период, 2 — медленная вспышка свечения, 3 — период угнетения свечения, 4 — быстрая вспышка после введения Fe^{2+} . По оси абсцисс — время после помещения митохондрий в кювету; по осям ординат: $[\text{Fe}^{2+}]$ — концентрация ионов Fe^{2+} , мкМ; [МДА] — концентрация продукта липидной пероксидации, малонового диальдегида; I — интенсивность хемилюминесценции, отн. ед. Стрелками указаны моменты добавления Fe^{2+} . (Из работы [149], подробнее см. работу [118].)

и изолированных тканей с использованием этих наиболее распространенных активаторов в диссертационной работе [102]). Традиционный активатор люминол используется для усиления хемилюминесценции, связанной с различными радикалами, — радикалами гидроксила, гипохлорита и других окислителей. Ряд активаторов обладает специфическим действием и используются для

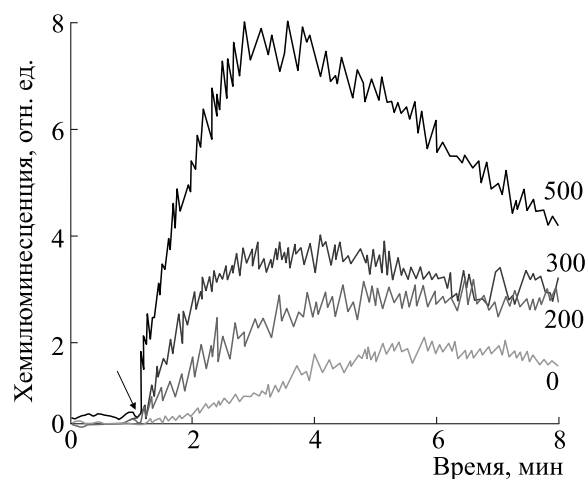


Рис. 10. Хемилюминесценция клеток крови в присутствии люминола после их стимуляции электрическими импульсами разного напряжения (около кривых указаны значения амплитуды импульсов в вольтах). (Из работы [152].)

определения отдельных видов радикалов. Например, люцигенин — специфический активатор свечения, обусловленного супероксидными радикалами, кумарин С-525 — специфический активатор хемилюминесценции липидных радикалов. Активированная хемилюминесценция используется для определения общей антиоксидантной активности различных веществ, а также плазмы и сыворотки крови пациентов при различных заболеваниях [127, 156, 158]. В ряде работ изучалась железо-индуцированная хемилюминесценция сыворотки и плазмы крови с использованием активаторов как метод определения окисляемости липопротеинов. В работах [159–161] исследование спонтанного ССС цельной или разбавленной крови, суспензий нейтрофилов, как в нативной системе, так и с добавлением активаторов ССС — люминола или люцигенина, позволило оценить ряд протекающих в ней свободнорадикальных процессов и их зависимость от температурных и оптических параметров.

Добавление в хемилюминесцентную систему антиоксидантов обычно осуществляется для решения двух задач: изучения действия исследуемых антиоксидантов в известной хемилюминесцентной системе [60] и определения типов свободных радикалов, генерируемых в изучаемой системе. Например, добавление супероксиддисмутазы позволяет выявить образование в биологическом материале супероксидного радикала.

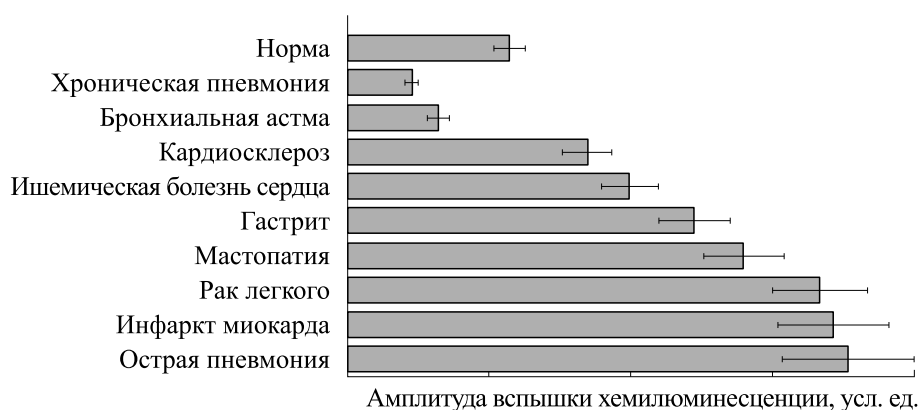


Рис. 11. Амплитуда хемилюминесцентных ответов изолированных лейкоцитов крови, полученной от больных различными заболеваниями. Стимулирование клеток осуществляли частичками латекса. (Из работы [152].)

В первую очередь, исследования ССС с добавлением химических веществ направлены на получение информации о процессах, связанных со свободными радикалами. Кроме того, методы хемилюминесцентного анализа позволяют определять следовые количества некоторых веществ в биологическом материале сравнительно простым образом. К исследуемому образцу добавляется реагент, который при взаимодействии с определяемым веществом приводит к хемилюминесценции. Например, для анализа на АТФ используют люциферин-люциферазный комплекс. Под воздействием фермента люциферазы люциферин окисляется кислородом при участии молекулы АТФ, при этом образуется оксилуциферин в возбужденном состоянии, люминесцирующем при релаксации. Даже относительно простой современный хемилюминометр, способный регистрировать световые потоки порядка 10^3 квантов в секунду, обеспечивает чувствительность метода около 10^{-15} моль/литр, при использовании более чувствительных хемилюминометров пороговая чувствительность соответственно будет выше.

Физические факторы. В отличие от химических физических факторы, которые используются для усиления ССС, обычно одновременно вызывают несколько эффектов: они оказывают как прямое влияние, т.е. непосредственно изменяют течение разных этапов процессов, обуславливающих хемилюминесценцию, так и не прямое влияние, т.е. обусловленное биологической реакцией исследуемого объекта.

Электрические импульсы вызывают повышенное образование в клетке АФК, во-первых, благодаря процессам образования радикалов на границе электролитической среды с электродами (прямое воздействие на повышение уровня АФК), во-вторых, благодаря повышению проницаемости биологических мембран (электропорация), которое стрессировывает клетку и вызывает био-

логический ответ с образованием АФК (например, [162] — в данной работе образование АФК регистрируется с помощью активированной люцигенином хемилюминесценции). Следует отметить, что электрохемилюминесценция относительно хорошо изучена на модельных средах, но в случае биологических объектов задействовано значительно большее количество разнообразных веществ, что затрудняет интерпретацию данных.

Влияние магнитного поля на ССС связано в основном с изменением концентрации свободных радикалов [163–165].

Отдельным обширным направлением явилась регистрация послесвечения биологических систем после их облучения видимым или УФ-светом, которое называют задержанной (замедленной) люминесценцией (delayed luminescence или delayed light emission). Этот термин объединяет широкий круг люминесцентных явлений разной природы, возникающих при фотовозбуждении разных систем. Единственным объединяющим свойством этих явлений служит тот факт, что время затухания замедленной люминесценции на порядки превышает время жизни возбужденного состояния пигмента-фоторецептора. Наиболее известным примером такой люминесценции служит замедленная флуоресценция фотосинтезирующих организмов, открытая Б.И. Стрелером и В. Арнольдом в 1957 г. [42]. Этому явлению посвящено огромное количество работ, поскольку оно позволяет выявлять промежуточные продукты, образующиеся при фотовозбуждении молекул хлорофилла в фотосинтетическом аппарате высших растений, водорослей и бактерий [166]. Простейшей фотофизической моделью такой люминесценции является замедленная флуоресценция и фосфоресценция органических пигментов и красителей, связанных с прямой дезактивацией их низших триплетных состояний (T1). Фосфоресценция возникает при прямой излу-

тельной дезактивации триплетного состояния, простейший тип замедленной флуоресценции (так называемый Е-тип) сопровождается термоактивированный переход триплетного состояния в возбужденное синглетное состояние [167, 168]. Например, замедленная флуоресценция Е-типа наблюдается в жидких растворах хлорофилла и других пигментов при комнатной температуре в анаэробных условиях [169–172]. ИК-фосфоресценция хлорофилла наблюдается в твердых средах, например, в замороженных растворах при низких температурах или при комнатной температуре в твердых полимерных пленках [173–176].

Детальному изучению замедленной люминесценции, возникающей в аэробных растворах пигментов и красителей в естественных условиях при отсутствии других окисляющихся субстратов, были посвящены многолетние работы группы А.А. Красновского мл. [177–187]. В этих условиях время жизни триплетных состояний красителей из-за их тушения кислородом воздуха уменьшено на несколько порядков величины по сравнению с анаэробными условиями, поэтому указанные выше «триплетные свечения» также ослаблены на порядки величины. При этом, поскольку тушение триплетных состояний кислородом сопровождается эффективным образованием синглетного кислорода, его инфракрасное свечение на длине волны 1270 нм становится одним из главных компонентов замедленной люминесценции аэробных растворов. Способность синглетного кислорода к этой люминесценции в растворах была обнаружена в этом цикле работ впервые [182–184]. Образовавшийся синглетный кислород окисляет исходные молекулы красителей, генерируя лабильные фотоперекиси, которые распадаются в результате термоактивированных процессов, что сопровождается собственной хемилюминесценцией (фотохемилюминесценцией) в видимой области спектра [177–179]. Спектр этой фотохемилюминесценции отличается как от спектра флуоресценции исходного красителя, так и от спектра люминесценции кислорода и его димеров. Наиболее вероятным эмиттером этой люминесценции служат продукты деградации красителей. Одновременно наблюдаются рекомбинационные процессы, приводящие к суммированию энергии двух молекул синглетного кислорода, что приводит к излучению света димерами синглетного кислорода или красителя. В отличие от работ групп М. Каши и Э.А. Огризло, которые наблюдали свечение димеров в газовой фазе или в пузырьках кислорода, выделяющихся при экзотермических реакциях перекиси водорода с окислителями [188–192], группе А.А. Красновского мл. удалось обнаружить аналогичные процессы в растворах [187, 193]. Однако в растворах при стационарном возбуждении квантовый выход этих про-

цессов существенно меньше, чем у ИК-свечения синглетного кислорода на длине волны 1270 нм.

Добавление в растворы красителей окисляемых субстратов, таких как липиды, белки и др., приводит к их окислению синглетным кислородом и появлению перекисей и свободных радикалов, которые являются источником хемилюминесценции. При действии видимого света на аэробные системы первичное образование синглетного кислорода является универсальным процессом.

При действии УФ света инициирование фотохемилюминесценции может идти и без синглетного кислорода за счет прямого фотолиза окисляемых соединений, приводящего к образованию свободных радикалов и перекисей [194–196].

Ниже мы приводим ряд относительно недавних работ по этой тематике, в которых исследованы различные по природе явления, относящиеся к типу замедленной люминесценции. Так, на рис. 12 приведена схема установки ARETUSA для исследования задержанной люминесценции. На этой установке с различными дополнительными техническими модификациями был выполнен значительный комплекс работ (например, [197–204]), в частности, для проведения спектральных исследований перед образцом размещались фильтры. Эти исследования показали, что помимо собственно кинетики регистрируемого свечения, важную информацию может нести ее спектральный состав [52, 205, 206].

В работах [207, 208] по кинетике кривой задержанной люминесценции оценивали степень когерентности электромагнитного поля в образце: когерентное электромагнитное поле должно было проявляться в гиперболической кинетике послесвечения, в отличие от некогерентного, которое должно было проявляться в экспоненциальной кривой. К сожалению, несмотря на увлеченность авторов этой элегантной идеей, достоверных результатов получено не было. В то же время кинетика послесвечения биологических объектов оказалась перспективным инструментом для оценки качества пищи и других прикладных исследований [198, 202, 209, 210], включая мониторинг состояния клеток и тканей [199–201, 204, 211].

Наночастицы. В последнее время активно развивается применение для исследований ССС наночастиц — они легко проникают внутрь клетки (особенно при дополнительном повышении проницаемости мембран путем электропорации). Механизмы усиления ССС плазмонными наночастицами металлов (Ag, Au и др.) довольно разнообразны — они одновременно могут выступать в роли инициаторов за счет активного формирования АФК на их высокореакционной поверхности, а также в роли физических активаторов за

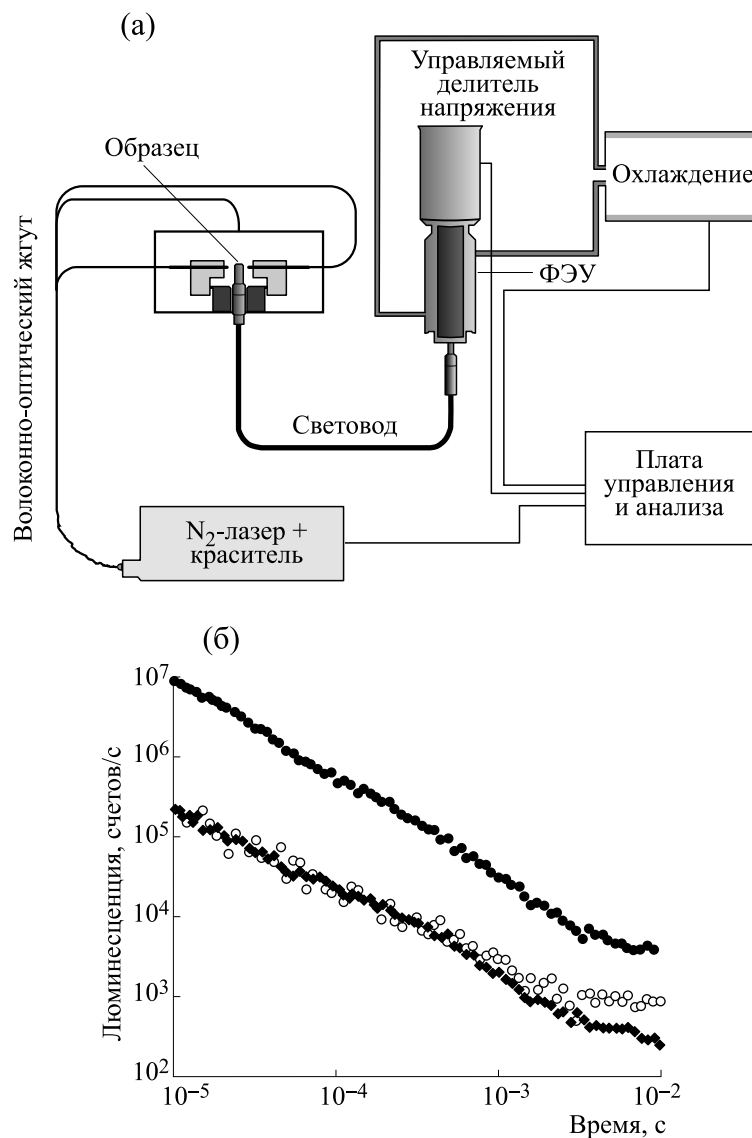


Рис. 12. (а) — Схема установки ARETUSA для исследований задержанной люминесценции (из работы [51]); (б) — пример типичного результата измерений задержанной люминесценции: ромбы — питательная среда (калий-фосфатный буфер), темные кружки — одноклеточные водоросли *Scenedesmus subspicatus*, светлые кружки — тот же образец после добавления анестетика (тиопентал натрия).

счет взаимодействия электронов проводимости с возбужденными состояниями близлежащих молекул или продуктов, возникновения локального плазмонного резонанса [165, 212–215].

СИСТЕМЫ 2D-ИЗОБРАЖЕНИЯ СВЕРХСЛАБЫХ СВЕЧЕНИЙ

Для получения изображений ССС используются как вакуумные электронные (ФЭУ), так и твердотельные (CCD-матрицы) устройства. Следует отметить, что имеется несколько работ с использованием фотографического метода для получения 2D-изображений ССС биообъектов (см. рис. 13), более того, использование нескольких

цветных фотопленок с разной спектральной чувствительностью позволяет дополнительно приближенно визуализировать и спектральные особенности [37–39]. Более активное применение фотографического метода затрудняет количественная обработка результатов.

Получение изображений с помощью вакуумных электронных устройств. Пространственное распределение интенсивности ССС редко исследуется путем последовательных измерений ССС на различных участках биообъекта с помощью обычных ФЭУ. Этот способ дает пространственное разрешение, сравнимое с размерами фотокада ФЭУ, и используется только для крупных

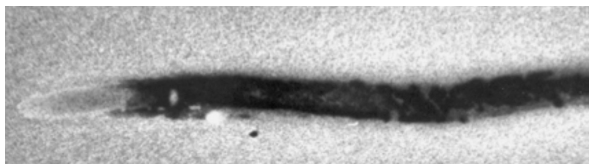


Рис. 13. Изображение ССС свежесрезанного корешка лука в черно-белом негативном изображении. Экспонирование в течение 2 мин через 3 с после отделения от луковицы, для регистрации использованы цветные многослойные галогенсеребряные фотопленки с общей светочувствительностью 64 ед. ГОСТ. (Из работы [38].)

объектов, например, таким образом проводилось картирование ССС тела человека на нескольких десятках участков площадью 9 см^2 [216]. Для получения более высокого пространственного разрешения используются координатно-чувствительные ФЭУ, в которых в процессе умножения электронов сохраняется информация о месте попадания фотона на фотокатод. Для сохранения координатной информации в таких ФЭУ используются динодные системы из сеток или в виде металлических каналов, а также микроканальные пластины (см., например, работу [35]). Насколько нам известно, для исследований ССС применялись только ФЭУ на основе микроканальных пластин, преимуществом которых является большее количество отдельных каналов в матрице, меньшая площадь сечения канала, высокий коэффициент заполнения, а также более простая технология изготовления.

Микроканальные пластины: принцип действия и технические особенности. Микроканальные пластины (МКП), устройства умножения потока электронов с пространственным разрешением, можно представить как матрицы коротких одно-

канальных умножительных трубок малого диаметра (рис. 14).

МКП имеют гораздо меньшую площадь сечения и длину отдельного канала электронного умножения, более короткое время пролета электронов по сравнению с динодными и распределенными одноканальными электронными умножителями. Эти элементы позволили реализовать большую площадь фотоприемника, обеспечить высокое пространственное и временное разрешение, что расширило области применения счетчиков фотонов [218–220] (см. также обзоры по истории МКП [221] и ранней истории МКП [222]), в частности позволило получать изображения ССС [223–225]. Временное разрешение ФЭУ с МКП достигает десятков пикосекунд, т.е. более чем на порядок лучше, чем у ФЭУ с динодами. Следует отметить, что недостатком МКП по сравнению с динодами является потеря части фотоэлектронов, которые не попадают внутрь микроканалов (у современных МКП такая потеря полезного сигнала составляет около 30%), вместе с тем шумы усиления у МКП тоже меньше. Обычно для регистрации ССС используются сборки из двух-трех последовательных МКП, обеспечивающих суммарный коэффициент усиления 10^6 – 10^9 . Системы на основе МКП работают в режиме реального времени и обеспечивают возможность пространственно-временной характеристики ССС, кроме того они используются для расчета статистики фотонов, корреляционного анализа [226].

2D-счетчики фотонов и примеры их применения в исследованиях сверхслабых свечений. На основе МКП были реализованы два основных типа схем, которые использовались для получения изображений ССС (рис. 15) [44]. В одном из них электронное изображение в виде лавин, локализованных в микроканалах МКП, принимает по-

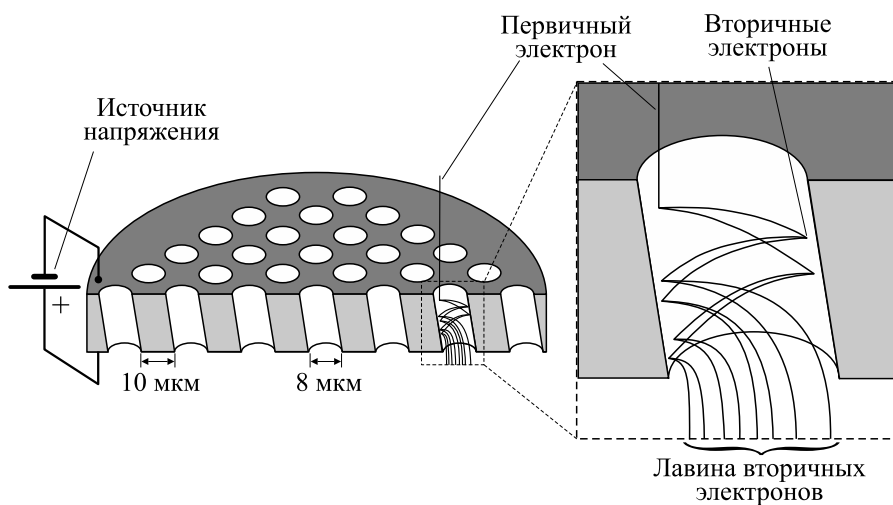


Рис. 14. Схема умножения потока электронов в МКП [217].

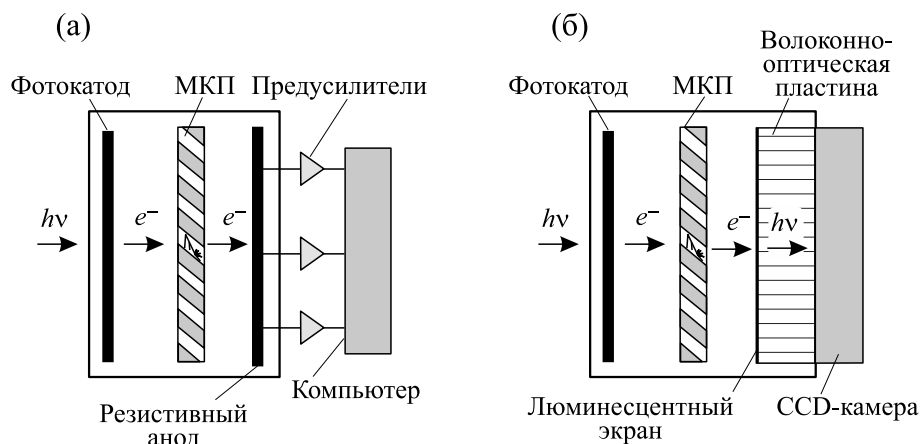


Рис. 15. Схемы 2D счетчиков фотонов: (а) — с позиционно-чувствительным анодом; (б) — с люминесцентным экраном и оптической камерой, т.е. с электронно-оптическим преобразованием (МКП на схеме обозначает сборку из нескольких МКП).

позиционно-чувствительный анод (наиболее распространенный вариант — резистивный анод) (рис. 15а). Пространственное 2D-распределение падающих фотонов рассчитывается по сигналам с анода, и при накоплении достаточного количества счетов на пиксель формируется изображение. С помощью такого устройства были получены первые изображения ССС растений, на которых было показано, что интенсивность специфично зависит от тканей [223, 224, 227]. В другой схеме (рис. 15б) лавина на выходе из микроканала попадает на люминесцентный экран и вызывает яркую вспышку. Таким образом, на экране в режиме реального времени возникает многократно усиленное по интенсивности изображение ССС, но в спектральном диапазоне свечения люминофора. Это изображение регистрируется обычными камерами, на которые фокусируется с помощью системы линз или передается с помощью волоконно-оптической пластины как на рис. 15б [44], подобные устройства с CCD-камерами называют также интенсифицированными CCD-камерами, они использовались, например, для исследования реакции ССС растений на стрессовые воздействия [48, 49]. Пространственное разрешение определяется размерами ячеек МКП и разрешением позиционно-чувствительного анода или люминесцентного экрана и камеры. Такие устройства, электронно-оптические преобразователи, использовались для изображения ССС корней соевых бобов [225], стрессового ССС проростков бобовых [228], имплантированных раковых опухолей [229]. Изображения ССС целого ряда живых биообъектов получила с помощью электронно-оптического преобразователя группа Х. Инабы [226, 230, 231].

На рис. 16 и 17 приведены примеры изображений ССС листьев коровьего гороха после зараже-

ния вирусом мозаики огурца, полученные с помощью устройства типа приведенного на рис. 15а. Временная последовательность изображений ССС демонстрирует развитие реакции гиперчувствительности растения (реакция гиперчувствительности растения — один из способов защиты растений от инфекций, он связан с образованием АФК) [232] (рис. 16). Внешние симптомы заражения (см. рис. 16б) проявляются значительно позднее и коррелируют с изображениями ССС. Изображения ССС на рис. 17 показывают подавление реакции гиперчувствительности растений ловушками АФК (тироном) [232].

Получение изображений с помощью твердотельных устройств (CCD-камер). *Технические особенности CCD-камер.* В настоящее время для получения 2D-изображений ССС в основном используются полупроводниковые приборы — охлаждаемые CCD-камеры с длительным накоплением заряда без блока электронного умножения [44, 233]. CCD-камеры с электронным умножением (electron-multiplying CCD, EMCCD) из-за малой рабочей площади и дополнительных шумов, связанных с электронным умножением, т.е. нестабильного коэффициента усиления потока электронов, в этой области пока применяются относительно редко [47, 234, 235]. Недавно было показано, что эти устройства позволяют получить достаточно хорошее для исследований ССС соотношение «сигнал/шум» (для излучения с интенсивностью $30 \text{ квантов} \cdot \text{см}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ соотношение «сигнал/шум» равно 3) [236]. Другой распространенный тип полупроводниковых приборов для получения 2D-изображений, CMOS-камеры (CMOS — complementary metal-oxide-semiconductor structure (англ.), комплементарная структура металл-оксид-проводник), несмотря на значительный прогресс в повышении квантового выхо-

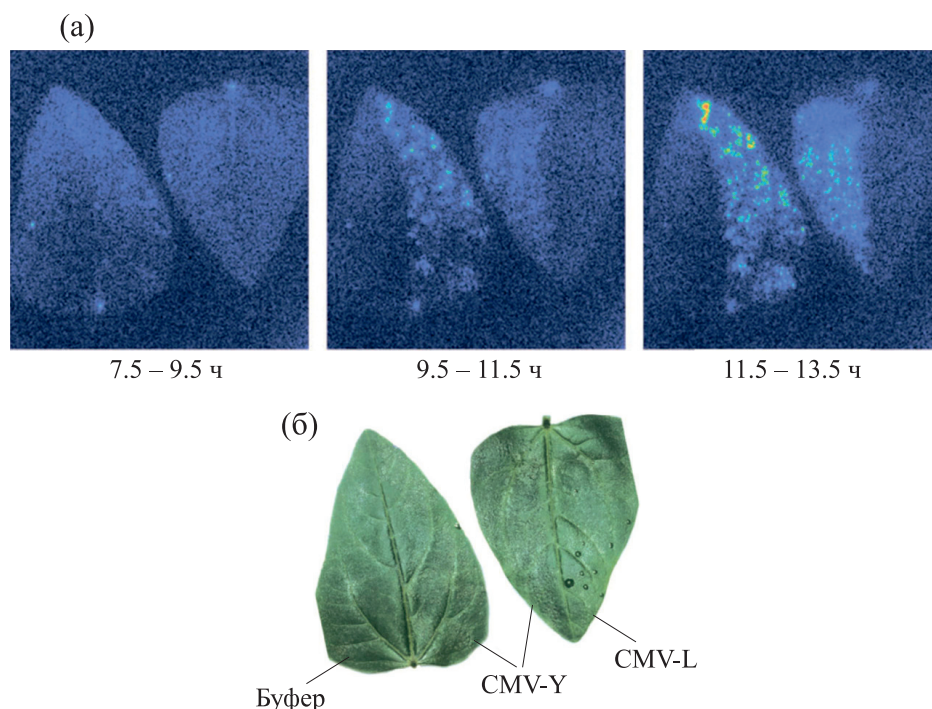


Рис. 16. Листья коровьего гороха, зараженные различными штаммами вируса мозаики огурца. Правая сторона левого листа и левая сторона правого листа заражены штаммом CMV-Y, который вызывает реакцию гиперчувствительности. Контрольная левая сторона левого листа обработана буферным раствором, не содержащим вируса. Правая сторона правого листа заражена штаммом CMV-L, который не вызывает реакции гиперчувствительности. (а) – Изображения ССС показывают пораженные участки уже через 10–16 часов, когда визуальные признаки поражения еще не видны. (б) – Листья через 24 ч после заражения, пораженные области совпадают с областями более интенсивного ССС. (Из работы [232].)

да и снижении шумов, все еще не могут обеспечить достаточное отношение «сигнал/шум» для излучения столь малых интенсивностей как ССС

биологических систем, хотя они иногда используются в полихроматической схеме спектрального анализа хемилюминесценции модельных хи-

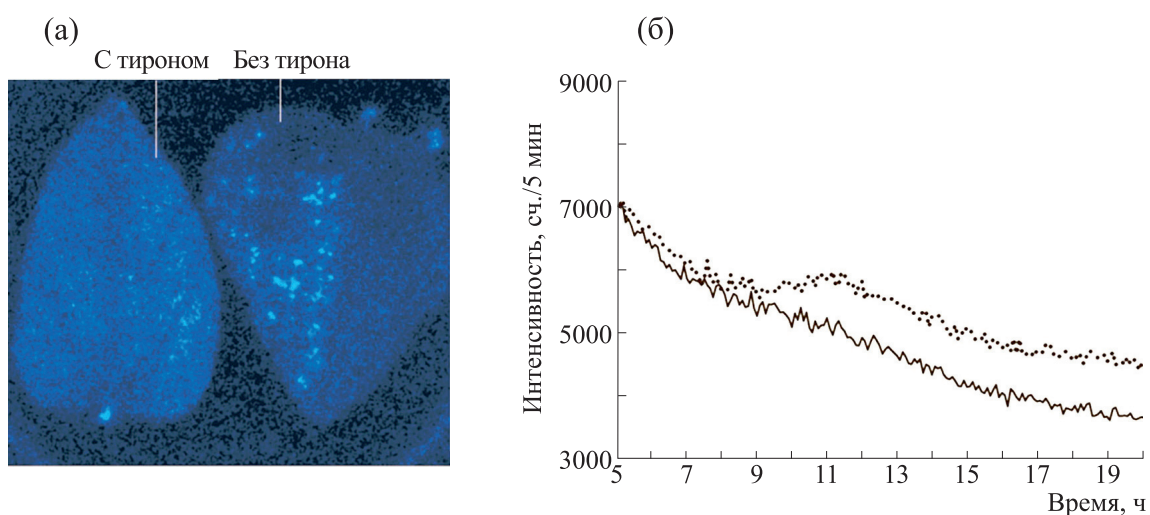


Рис. 17. Влияние ловушек АФК на ССС листьев коровьего гороха, зараженных вирусом мозаики огурца, который вызывает реакцию гиперчувствительности. (а) – ССС-изображение: половина каждого листа заражена вирусом, левый лист дополнительно был обработан тироном (ловушка АФК), правый лист – контрольный. (б) – Временные зависимости ССС: сплошная линия – ССС листа, обработанного тироном, точки – ССС контрольного листа. (Из работы [232].)

мических систем, у которых интенсивность излучения несколько выше [237].

Из-за низкой интенсивности ССС CCD-камеры используют с длительным временем накопления, кроме того, применяется биннинг (суммирование сигнала от соседних пикселей), который позволяет повысить временное разрешение за счет снижения пространственного разрешения сигнала. Биннинг на физическом/аппаратном уровне, т.е. считывание уже суммированных сигналов, дает меньше шумов, чем программный биннинг, т.е. попиксельное считывание с последующим суммированием и усреднением сигнала от соседних пикселей с помощью компьютерной обработки. Разница обусловлена шумами считывания, например, при считывании суммарного сигнала от четырех пикселей шум считывания добавляется однократно, а при их считывании по отдельности — четырежды, потом при усреднении и 50%-м масштабировании он уменьшается как квадратный корень из 4, т.е. в 2 раза, таким образом, эти шумы при программном биннинге в два раза выше. Зависимость качества изображения ССС от биннинга и времени накопления иллюстрирует рис. 18 из работы [238].

При длительном накоплении сигнала охлаждаемые CCD-камеры имеют шумы, сравнимые с вакуумными электронными устройствами. Преимуществами CCD-камер по сравнению с последними являются более высокий квантовый выход и, как правило, более высокое пространственное разрешение, к недостаткам относится более низкое временное разрешение изображений. Расчеты, выполненные в работе [239] показывают, что при достаточно глубоком охлаждении и длительном накоплении сигнала CCD-камеры превосходят по соотношению «сигнал/шум» координатно-чувствительные фотоумножители.

Примеры применения CCD-камер для исследований ССС. Первое ССС-изображение (проростков соевых бобов) с помощью охлаждаемой жидким азотом CCD-камеры было получено М. Кобаяши с соавторами [233]. В настоящее время именно CCD-камеры являются основным средством регистрации 2D-изображений ССС биообъектов. В частности, с помощью CCD-камеры были получены изображения эндогенного ССС не обладающих биолюминесценцией насекомых в процессе метаморфоза [240], растущей опухоли мыши (привитый рак) [43, 229], мыши с индуцированным ревматоидным артритом [241]. Изображения мыши с артритом и злокачественной опухолью демонстрируют корреляцию спонтанного ССС с патологическими состояниями, сопровождающимися окислительным стрессом, — повышенное ССС в опухоли было объяснено повышением пролиферативной активности клеток, связанной

с более интенсивным метаболизмом в раковых клетках [43], повышенное ССС в области суставов мыши с ревматоидным артритом свидетельствует о том, что это заболевание приводит к образованию АФК, вызывающих хроническое воспаление за счет аутоиммунного процесса [241]. В целом ряде работ были исследованы изображения ССС человека [216, 242, 243] (см. также обзорную работу [47]). Изображения спонтанного ССС верхней половины тела здорового человека показали, что интенсивность свечения максимальна в области лица, это было отнесено к тому, что кожа лица подвержена регулярному воздействию УФ-излучения и в связи с этим отличается по состоянию окислительного стресса [216, 242]. При исследованиях изображений ССС в динамике [242] были установлены суточные ритмы свечения тела человека (максимальная интенсивность ССС наблюдается в 16 ч дня, минимальная в 10 ч утра), самая высокая интенсивность была зарегистрирована в районе щек, где она достигала $3000 \text{ фотонов} \cdot \text{см}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ в 16 ч и была примерно в два раза меньше в 10 ч. Сравнение изображений ССС и тепловизионных снимков показало, что распределение интенсивности ССС по телу не коррелирует с распределением температуры, суточные ритмы ССС также не были связаны с ритмами изменений температуры тела [242]. Были проведены сравнения спонтанного ССС руки и ССС после облучения руки синим светом [244], ССС в пределах облученной области было примерно в три раза выше, чем в необлученной (т.е. спонтанное ССС), это связано с тем, что синий свет вызывает окислительный стресс в клетках и тканях. Таким образом, изображения ССС перспективны для диагностики различных заболеваний, связанных с окислительным стрессом. Системы изображения применяются также и для исследований самого явления ССС [65, 245–247].

СПЕКТРАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СВЕРХСЛАБЫХ СВЕЧЕНИЙ

Начиная с «митогенетического» периода исследований ССС, спектральный анализ использовался для двух типов задач. Во-первых, это исследование явлений, обуславливающих ССС, т.е. выяснение механизмов люминесценции, идентификация веществ, образующихся в электронно-возбужденном состоянии. Как было установлено еще в 1930-х гг. энергия, выделившаяся в химических реакциях, являющихся источником энергии ССС, часто высвечивается молекулами, не принимающими в них участия (например, работы [248, 249], см. также подраздел «Сенсибилизированная флуоресценция» в ч. 2 настоящего обзора [1]). Во-вторых, исследование спектральных особенностей востребовано в целях характеристики самого биообъекта, получения информации о его состоянии. Для исследований спектра ССС ис-

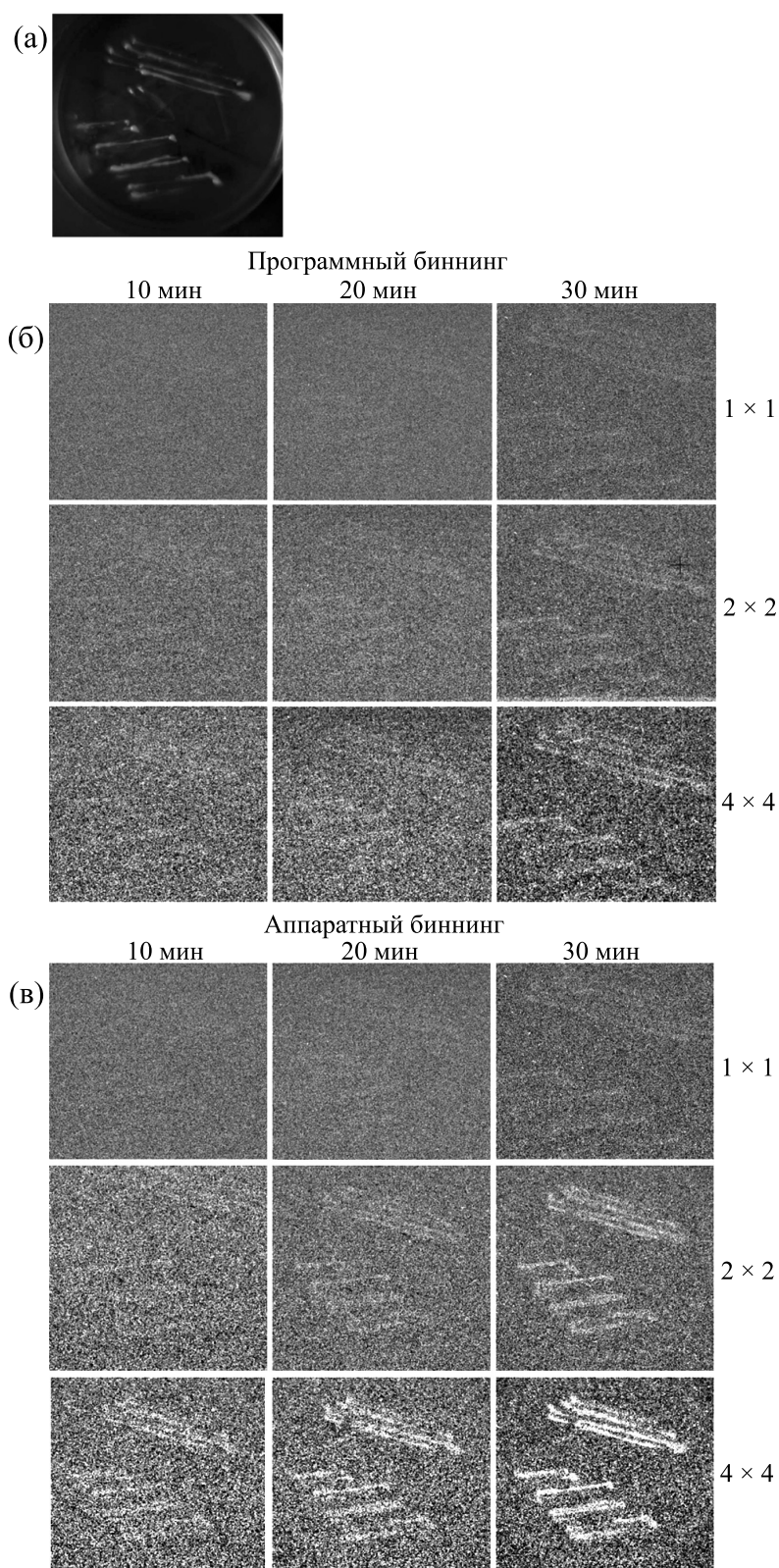


Рис. 18. Фотография (а) и ССС-изображения (б, в) дрожжевой культуры (*Saccharomyces cerevisiae*). Изображения ССС получены на ССD-камере в режиме программного (б) и аппаратного (в) биннинга с различными коэффициентами биннинга (1×1 , 2×2 , 4×4) и временем накопления (10, 20, 30 мин). ССD-камера расположена в 30 см от объекта. (Из работы [238].)

пользуются как монохроматическая схема, т.е. с последовательным измерением интенсивности излучения в ряде спектральных областей [134], так и полихроматическая, когда излучение, разложенное в спектр, одновременно регистрируется рядом детекторов или матрицей [45, 227, 234, 235, 250, 251]. Следует отметить, что первые исследования спектров ССС в «митогенетический» период также проводились и в полихроматическом [252, 253], и в монохроматическом [254, 255] вариантах, кроме того из-за трудоемкости биологических методик детектирования была использована двухстадийная схема — грубый анализ с полихроматической схемой, затем в областях с зарегистрированным излучением — спектральный анализ с монохроматором, обеспечивающий более высокое разрешение, например, [256] (см. также подраздел «Метод спектрального митогенетического анализа» в ч. 2 настоящего обзора [1]). Обычно для спектрального анализа ССС в монохроматической схеме используются светофильтры из цветного стекла (см., например, работы [257–262] и описание схемы в работе [263]), они хорошо подходят для фильтрации ненаправленного излучения и позволяют обеспечить светосбор с максимальной площади объекта. Смена светофильтров производится механически, разрешение спектров составляет порядка десятков нанометров (см., например, работы [257, 262, 263]). Относительно низкое пропускание фильтров и необходимость последовательного измерения каждой полосы значительно ухудшают возможности временного разрешения, поэтому такой спектральный анализ используется обычно для измерений относительно стабильного во времени ССС.

В качестве примера техники для спектрального анализа с фильтрами рассмотрим установку, разработанную в группе Х. Инабы для диапазона 250–850 нм [257]. Вращающийся диск с 37 светофильтрами в виде цветных стекол с резкой границей пропускания размещали между детектором излучения и излучающим объектом, обеспечивая пропускание ССС поочередно через каждый из светофильтров, а также через открытую диафрагму. Открытая диафрагма нужна для корректировки плавных изменений полной интенсивности ССС в течение измерений. Интенсивность излучения в полосах между границами пропускания фильтров определяли, вычитая соответствующие интенсивности. При этом использовали два мультищелочных ФЭУ, чувствительных в диапазонах 300–900 нм и 160–650 нм. При расчете спектров учитывали темновые счета для фильтров и спектральную чувствительность ФЭУ. Эта установка обеспечивала спектральное разрешение 20–30 нм в диапазоне 300–700 нм и 30–50 нм в остальном рабочем диапазоне.

Более совершенной схемой спектрального анализа ССС биообъектов является полихроматическая, при этом спектральное разложение исследуемого излучения проводится обычно с помощью дифракционных решеток, а для регистрации соответствующего 2D-изображения используются охлаждаемые CCD-камеры [45, 245], фотоумножители с позиционно-чувствительным анодом (рис. 15а) [227] или координатно-чувствительным преобразованием (рис. 15б) [250]. Ширина входной щели определяет баланс между интенсивностью падающего на приемник излучения и спектральным разрешением. Для полихроматической схемы измерений в качестве детекторов начали использоваться и CCD-камеры с электронным умножением (EMCCD) [234, 235].

Полихроматическая схема обеспечивает более высокую чувствительность и лучшее временное разрешение, чем монохроматическая (см. сравнение расчетных зависимостей отношения «сигнал/шум» от интенсивности падающего излучения для полихроматической и монохроматической схем с дифракционной решеткой и соответствующие экспериментальные результаты в работе [250]), поэтому полихроматический спектральный анализ имеет существенные преимущества, когда требуется исследовать ССС в динамике, например фотоиндуцированное ССС.

АНАЛИЗ ОСОБЕННОСТЕЙ ВРЕМЕННОГО РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ФОТОНОВ СВЕРХСЛАБОГО СВЕЧЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ

В большинстве исследований ССС характеризуется усредненной интенсивностью излучения — при исследованиях изменения интенсивности в динамике, получении двумерных изображений или спектра ССС и т.п. накопление сигнала осуществляется в течение периода времени, достаточного, чтобы выделить и оценить среднюю интенсивность на фоне дробового шума самого ССС и темновых счетов ФЭУ.

Другой подход к исследованиям ССС направлен не на характеристику средней интенсивности, а на выяснение статистических характеристик шумовой компоненты. Толчок к развитию этого подхода и методологии исследований временного распределения фотонов дала гипотеза об уникальной, аномально высокой когерентности ССС биообъектов [264–268]. Хотя гипотеза не получила достаточного подтверждения [27, 269–271], и было показано, что характерное время когерентности сверхслабого свечения в оптическом диапазоне, по-видимому, не превышает наносекунд [272–274], но на основе развитых методов сформировалось вполне самостоятельное направление исследований.

Для анализа особенностей временного статистического распределения фотонов обычно используются так называемые сырые данные ФЭУ, в виде последовательностей интервалов между импульсами — временных рядов. Техника регистрации ССС при этом не имеет принципиальных отличий (кроме того, что используется счетчик, который регистрирует интервалы между электрическими импульсами), но при этом предъявляются повышенные требования к временному разрешению и стабильности работы детектора фотонов. Для повышения стабильности чувствительности детектора на длительных интервалах используется высокая стабилизация температуры и для питания ФЭУ применяются источники высоковольтного напряжения с высокой стабильностью и низким уровнем пульсаций. Например, в работе [275], в которой экспериментальная установка на основе ФЭУ для регистрации временных рядов была описана наиболее детально, температура фотокатода ФЭУ поддерживалась равной -80°C с точностью $\pm 0.1^{\circ}\text{C}$. Значительное количество исследований посвящено статистике фотонов ССС различных биологических объектов [276], в основном прорастающих семян [277–279] и поверхности тела человека [280, 281] (см. также обзор [271]). Некоторые авторы предложили использовать статистику фотонов и корреляционный анализ временных рядов ССС для характеристики состояния биологических систем [275, 278], в частности использовать их для медицинской диагностики [281]. Путем корреляционного анализа в ряде работ было показано, что ССС имеет характер вспышек (например, работа [282]), что согласуется с результатами ранних авторов, полученными методами биологического детектирования [283] (методы биологического детектирования рассмотрены в ч. 2 настоящего обзора [1]). Для исследования шумовых компонент ССС применяли различные методы цифровой обработки первичных данных, полученных на ФЭУ (автокорреляционный, Фурье- и вейвлет-анализ, в частности, мультифрактальный вейвлет-анализ и др.) [277, 278, 284, 285].

Развитые для исследований ССС методы нашли применение и для анализа статистики фотонов видимой глазом биoluminesценции, другого типа свечения живых организмов, на несколько порядков превосходящего по интенсивности ССС, например, было показано, что биoluminesценция светящихся бактерий также имеет характер вспышек и подчиняется суперпуассоновской статистике [286].

ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ОПТИЧЕСКОГО ПРОСВЕТЛЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ТКАНЕЙ ДЛЯ ЭФФЕКТИВНОГО СБОРА ПОТОКОВ СВЕРХСЛАБЫХ СВЕЧЕНИЙ БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМ

Один из весьма перспективных подходов к работе с оптическими свойствами живой ткани, до настоящего времени практически не используемый в исследованиях ССС, — это технология оптического просветления. Несмотря на значительную отдаленность этой области, используемой в микроскопических исследованиях в биологии и спектроскопических и томографических исследованиях в медицине, а также ее «побочные эффекты» — возможное влияние на свободнорадикальные процессы и соответственно процессы генерации фотонов, мы считаем ее одной из возможных «точек роста» в исследованиях ССС. Ниже приводим краткое описание этой технологии.

Биологические ткани представляют собой материалы с низким уровнем поглощения и высокой рассеивающей способностью в видимой и ближней ИК-области спектра со спадом величины рассеяния по мере продвижения в ИК-область, в то время как в УФ-диапазоне и рассеяние, и поглощение оказываются значительными [287]. Спектральные свойства тканей как ключевые параметры для детектирования и визуализации ССС определяются индивидуальными спектральными характеристиками поглощающих хромофоров и рассеивателей. Наиболее важными хромофорами являются вода, гемоглобин (оксигенированный и деоксигенированный), меланин, липофусцин, билирубин, липиды, каротиноиды, цитохромы и некоторые другие. Рассеяние определяется морфологией ткани, а именно размерами отдельных микрокомпонентов ткани и их показателем преломления относительно показателя преломления окружающей их среды. Именно разница показателей преломления клеточных мембран, цитоплазмы, ядер, митохондрий, других органелл, межтканевой жидкости и других компонентов тканей определяет характер упругого рассеяния света в тканях.

Рассеяние и поглощение определяют не только спектральные свойства света, распространяющегося и взаимодействующего с живыми тканями, но также глубину его проникновения и пространственное распределение света внутри ткани. Более того, оба явления тесно взаимосвязаны друг с другом, потому что низкое рассеяние приводит к меньшему пути взаимодействия для поглощения фотонов, и наоборот, большее рассеяние дает гораздо более длинные пути пробега фотонов и поэтому эффективность поглощения увеличивается. Если поглощение хромофоров в ткани очень велико, то эмитируемые фотоны не могут распространяться внутри ткани на большие расстояния. В противоположном случае, когда поглощение мало, а рассеяние велико, то фотоны путешествуют внутри ткани в течение длительного времени по очень длинным ломаным траекто-

риям, таким образом, свет становится диффузным и освещает большие объемы ткани.

Оптические свойства живой ткани можно изменять с помощью различных эффектов физической или химической природы [287–320]. Одним из привлекательных методов, широко используемым в физиотерапии, является местная обработка ткани биосовместимыми растворами, маслами или гелями. Многие из возникающих при этом оптических явлений хорошо объясняются в рамках теории дисперсных физических систем, что дает возможность эффективного управления оптическими свойствами таких систем, изменяя 1) показатель преломления рассеивателей или базового вещества, 2) упаковку рассеивателей и 3) их размеры [287–320]. В свою очередь, изменение этих микропараметров влечет за собой изменение макропараметров, а именно толщины слоя ткани и объемной доли таких компонентов, как вода, белки и липиды, которые также влияют на пропускание света через ткани с характерными деформациями спектров.

Управление оптическими свойствами ткани при воздействии оптических просветляющих агентов (ОПА) — это новая технология, называемая иммерсионным оптическим просветлением ткани (ОПТ) [287–320]. Многие ОПА являются гиперосмотическими агентами и широко используются в медицине, косметологии и пищевой промышленности для несколько других целей. Одним из наиболее важных применений некоторых ОПА в биологии и медицине является их использование в качестве криоконсервирующих (криозащитных) жидкостей для поддержания клеток и тканей в живом состоянии при использовании в клеточной терапии и для имплантации органов [306].

Чаще всего используются следующие ОПА: глицерин, пропиленгликоль, этиленгликоль, полиэтиленгликоль, глюкоза, фруктоза, а также рентгеноконтрастные или МРТ-контрастные агенты [287, 317]. ОПТ является перспективной технологией, которая благодаря своей простоте и высокой эффективности позволяет находить новые области применения в биологии и медицине на клеточном, тканевом и органном уровнях. Она позволяет эффективно снизить коэффициент рассеяния и увеличить коэффициент анизотропии рассеяния и, соответственно, увеличить оптическое пропускание слоя ткани; именно в этом состоит оптическое просветление. В результате в ткани распространяются в основном фотоны с короткими зигзагообразными траекториями, и появляется большая доля баллистических фотонов, которые не отклоняются, что позволяет доставлять больше света к локализованному детектору от слабых источников хемилюминесценции внутри ткани.

ОПТ повышает эффективность обнаружения слабых фотонных (люминесценция/флуоресценция) сигналов из глубины ткани, производимых раковыми клетками или патогенами [290, 293, 317]. Например, в работе [293] с помощью местного применения ОПА на основе глицерина и ДМСО удалось значительно увеличить интенсивность люминесценции *Salmonella typhimurium* через кожу свиньи.

Пропускание коллимированного узкого светового пучка через слой ткани толщиной z описывается законом Бугера—Бера—Ламберта, который справедлив для описания ослабления потока баллистических фотонов [287]:

$$T_c = I(z)/I_0 = \exp(-\mu_t z),$$

где I_0 и $I(z)$ — интенсивности падающего и прошедшего световых потоков соответственно, μ_t — коэффициент экстинкции (ослабления) потока излучения:

$$\mu_t = \mu_a + \mu_s,$$

μ_a — коэффициент поглощения, а μ_s — коэффициент рассеяния.

Длину ослабления для потока баллистических фотонов можно ввести как

$$l_t = \frac{1}{\mu_t}. \quad (1)$$

Ослабление в ткани диффузного светового потока с интенсивностью I_0 можно описать с помощью закона Бугера—Бера—Ламберта, модифицированного для учета многократного рассеяния в диффузионном приближении [287]:

$$T_d = I_d(z) / I_0 = \exp(-\mu_{\text{eff}} z), \quad (2)$$

где $I_d(z)$ — интенсивность света, переносимого на расстояние z от исходного внутреннего источника люминесценции с интенсивностью I_0 , μ_{eff} — эффективный коэффициент ослабления:

$$\mu_{\text{eff}} = \sqrt{3\mu_a(\mu_a + \mu'_s)}, \quad (3)$$

где μ'_s — приведенный коэффициент рассеяния:

$$\mu'_s = (1 - g)\mu_s. \quad (4)$$

Здесь g — коэффициент анизотропии рассеяния ткани, характеризующий степень анизотропии однократного рассеяния ($g = 0$ — полностью изотропное рассеяние, а $g = 1$ — полностью анизотропное рассеяние в направлении вперед).

Характерная длина, на которой диффузный поток излучения в ткани спадает в e раз, определяется уравнением (4) и равна

$$l = 1/\mu_{\text{эфф}}. \quad (5)$$

Для многих тканей в широком диапазоне длин волн от УФ до ближнего ИК $\mu_s \gg \mu_a$, поэтому для

повышения оптического пропускания ткани (см. уравнения (1) и (4)) и увеличения характерной длины распространения для баллистического и диффузного потоков фотонов (см. уравнения (3) и (7)) можно уменьшать коэффициент рассеяния μ_s или приведенный коэффициент рассеяния (также за счет уменьшения μ_s или за счет увеличения g , от типичного значения 0.9 для мягких тканей вплоть до значений, близких к 1.0).

Типичная мягкая биоткань состоит из тонкого верхнего клеточного эпителиального слоя и подлежащей соединительной ткани (стромы) с сетью волокон, погруженных в интерстициальную жидкость (ISF). Модель ткани можно представить как структуру с пространственными вариациями показателя преломления (ПП) [287]. ПП основ-

ного вещества $\bar{n}_0$ можно определить как средневзвешенное значение ПП цитоплазмы n_{cp} и интерстициальной жидкости n_{ISF} с учетом их объемных долей f_{cp} и f_{ISF} , используя правила смешения ПП (закон Гладстона и Дейла) [287, 292, 306].

$$\bar{n}_0 = f_{cp}n_{cp} + (1 - f_{cp})n_{ISF}. \quad (6)$$

Средний ПП рассеивателей $\bar{n}_s$ можно представить как сумму ПП основного вещества $\bar{n}_0$ и дополнения, определяемого ПП тканевых волокон $\bar{n}_s$, волокон n_f , ядер клеток n_{nc} и других органелл n_{or} с соответствующими объемными долями f_f, f_{nc} и f_{or} [287, 292, 306]:

$$\bar{n}_s = \bar{n}_0 + f_f(n_f - n_{ISF}) + f_{nc}(n_{nc} - n_{cp}) + f_{or}(n_{or} - n_{cp}). \quad (7)$$

Коэффициент рассеяния ткани зависит от разности ПП рассеивателей $\bar{n}_s$ и окружающей среды (основного вещества) $\bar{n}_0$. Для простейшей модели ткани в виде монодисперсной системы диэлектрических сфер приведенный коэффициент рассеяния μ'_s описывается как [287–289]:

$$\mu'_s = 3.28 \pi a^2 \rho_s \left(\frac{2\pi \bar{n}_0 a}{\lambda_0} \right)^{0.37} (m - 1)^{2.09}, \quad (8)$$

где a — радиус рассеивающих частиц (клеточных органелл и т. д.); ρ_s — объемная (числовая) плотность частиц, то есть общее количество рассеивающих частиц в единице объема, f_s/V_s , где f_s — объемная доля частиц по отношению к общему объему, а V_s — объем отдельной рассеивающей частицы, $V_s = (4/3)\pi a^3$ для сферической частицы; λ_0 — длина волны света в вакууме; $m = \bar{n}_s / \bar{n}_0$ — относительный ПП рассеивающих частиц и основного вещества. Уравнение (10) справедливо для следующего диапазона структурных параметров ткани: $g > 0.9$, $5 < (2\pi a/\lambda) < 50$, $1 < (\bar{n}_s / \bar{n}_0) < 1.1$, т.е. для невзаимодействующих «оптически мягких» рассеивателей Ми, что типично для многих мягких тканей.

Описанные модели тканей применимы к мягким тканям, таким как кожа и мышечная ткань. По сравнению с межтканевой жидкостью и цитоплазмой рассеивающие частицы плотнее, имеют более высокий ПП и менее проницаемы для любых молекул, включая молекулы воды и ОПА. Для обеспечения оптического просветления ткани ПП ОПА должен быть выше, чем средний ПП основного вещества $\bar{n}_0$. Когда молекулы ОПА диффундируют в ткань или индуцируют поток воды из ткани наружу за счет своих гиперосмоти-

ческих свойств, разность ПП рассеивателей и основного вещества будет уменьшаться, таким образом $m \rightarrow 1$, а $\mu_s \rightarrow 0$ и $g \rightarrow 1$ [287]. В свою очередь, транспортная длина свободного пробега фотона, определяющая среднюю длину его переноса до акта поглощения или значительного изменения направления распространения, равная

$$l_{tr} = \frac{1}{\mu_a + \mu'_s} \quad (9)$$

значительно увеличивается при согласовании ПП рассеивателей и окружающей среды.

Из уравнения (10) следует, что небольшое увеличение ПП $\bar{n}_0$, например от 1.35 до 1.39, а затем и до 1.41, при постоянном значении $\bar{n}_s = 1.47$, приводит к уменьшению приведенного коэффициента рассеяния μ'_s в 2.4 и 4.5 раза соответственно (см. табл. 2). Соответственно, при постоянном g коэффициент рассеяния μ_s также будет уменьшаться в 2.4/4.5 раза. Для $\bar{n}_0 = 1.41$ поток баллистических фотонов через тонкий слой ткани (см. уравнение (1)) увеличивается примерно в два раза для слоя толщиной 0.1 мм и в 47 раз для более толстого рассеивающего слоя ткани 0.5 мм, для которого до оптического просветления ослабление было значительным, $\mu_s \times z = 5$. Для диффузного света эффективность оптического просветления не такая высокая и может достигать 2.6 раза для толстого слоя ткани с повышением коэффициента пропускания T_d от 17 до 44%. Следует отметить, что эти оценки были сделаны для фиксированного фактора анизотропии рассеяния $g = 0.9$, который имеет тенденцию приближаться к единице при оптическом просветлении, поэтому эффективность для T_d может быть несколько выше, чем показано в табл. 2.

Таблица 2. Оценка эффективности ОПТ для ткани с начальным рассогласованием ПП

	$\bar{n}_0$	m	$\mu'_s, \text{см}^{-1}$	$\mu_s, \text{см}^{-1}$ ($g = 0.9$)	$l_{tr}, \text{см}$	$l_d, \text{см}$	T_c		T_d	
							$Z = 0.01 \text{ см}$	$Z = 0.05 \text{ см}$	$Z = 0.1 \text{ см}$	$Z = 1.0 \text{ см}$
Исходные параметры	1.350	1.089	10	100	0.10	0.57	0.37	0.007	0.84	0.17
ОПТ1	1.390	1.058	4.2	42	0.23	0.88	0.66	0.12	0.89	0.32
ОПТ2	1.410	1.042	2.2	22	0.43	1.20	0.80	0.33	0.92	0.44
ОПТ1/исх	—	—	0.42	0.42	2.30	1.54	1.78	17.1	1.06	1.88
ОПТ2/исх	—	—	0.22	0.22	4.30	2.10	2.16	47.1	1.09	2.6

Примечание. $\bar{n}_s = 1.470$, $\bar{n}_0 = 1.350$, $\mu_s = 100 \text{ см}^{-1}$, $\mu_a = 0.1 \text{ см}^{-1}$, $g = 0.9$.

В случае исследований *in vivo* более выраженными становятся и другие механизмы ОПТ [287, 291–297, 320]. Например, действие гиперосмотических ОПА вызывает временную и обратимую дегидратацию тканей, что приводит к дополнительному согласованию ПП, сжатию ткани и соответственно установлению ближнего порядка компонентов ткани (рассеивателей). Временная и обратимая диссоциация биологических молекул на более мелкие фрагменты приводит к некоторому уменьшению рассеяния. Кровь как система частиц, демонстрирующая ярко выраженные эффекты оптического просветления при условии согласования ПП, дает свой вклад в ОПТ, который может модифицироваться за счет агрегации, набухания или сжатия эритроцитов при действии ОПА [292, 318].

Чтобы учесть влияние ближнего порядка рассеивателей, возникающего при действии ОПА, на изменение коэффициента рассеяния и соответственно на эффективность ОПТ, уравнение (10) следует модифицировать, используя простую эвристическую модель взаимодействия частиц [288]:

$$(\mu'_s)_{\text{mod}} = \mu'_s \times (1 - f_s). \quad (10)$$

Согласно уравнениям (1) и (12), если объемная доля частиц f_s мала, рассеяние невелико. Оно также мало, когда f_s приближается к единице (плотная упаковка). Максимальное рассеяние ожидается при $f_s = 0.5$. Для нормальных мягких тканей объемная доля рассеивателей находится в диапазоне от 0.2 до 0.6, поэтому для некоторых из них дегидратация тканей на начальном этапе применения гиперосмотического ОПА может вызвать

некоторое увеличение коэффициента рассеяния, в то время как для более плотных тканей всегда происходит уменьшение коэффициента рассеяния за счет этого механизма.

Концепция «оптических окон прозрачности» плодотворна для оценки характера переноса оптического излучения определенного диапазона длин волн при обнаружении слабой люминесценции из глубины ткани и ожидаемой деформации спектра детектируемого излучения за счет внутренней фильтрации излучения структурами ткани. Обычно имеется несколько «оптических окон» в видимом и ближнем ИК-диапазонах, однако технология ОПТ позволяет открывать несколько новых виртуальных «оптических окон» в УФ-области и использовать их для доставки оптического сигнала [287, 292, 306, 307, 309, 316, 319]. Сильное рассеяние биологических тканей в УФ-диапазоне препятствует широкому использованию УФ-технологий в биологии и медицине. Следовательно, возможность временного подавления сильного рассеяния света с помощью подходящих ОПА, прозрачных в УФ-диапазоне, может значительно повысить эффективность технологии ОПТ в этом диапазоне.

Например, в работе [316] для исследования *ex vivo* образцов альвеолярных десен свиней толщиной образцов (0.59 ± 0.08) мм в качестве ОПА использовали высококонцентрированный водный раствор глицерина 87.5%. Важно, что глицерин не имеет полос поглощения в диапазоне 150–800 нм. После погружения образцов ткани десны в 87.5%-й раствор глицерина коэффициент пропускания ткани увеличивается по сравнению с нативными образцами во всем спектральном диапазоне

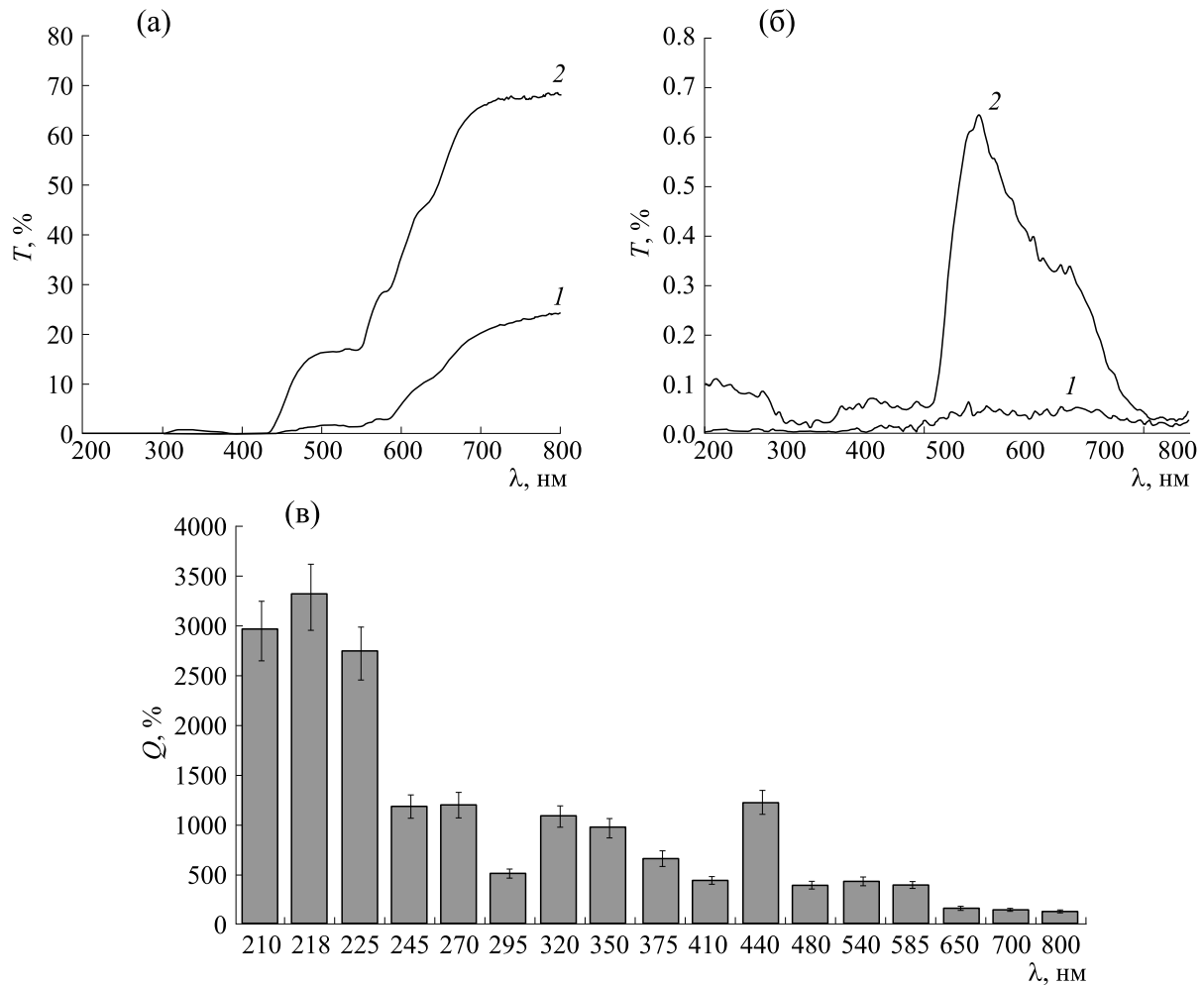


Рис. 19. Спектры полного оптического пропускания образца десны свиньи, измеренные с помощью интегрирующей сферы до (кривые 1) и после (кривые 2) аппликации 87.5%-раствора глицерина в течение 100 мин, в диапазоне длин волн: 200–800 нм (а) и 200–400 нм (б); расчетная эффективность оптического просветления по данным измерений (в) (из работы [316]).

(рис. 19а,б), что связано с уменьшением рассеяния света в ткани. В областях 415–420 нм и 540–580 нм спектральные особенности соответствуют полосам поглощения оксигемоглобина (415, 542 и 576 нм).

Эффективность ОПТ можно определить как

$$Q(T) = \frac{T(t) - T(t=0)}{T(t=0)} \times 100\%, \quad (11)$$

где $T(t=0)$ – коэффициент полного пропускания слоя ткани в начальный момент времени (до применения ОПА), $T(t)$ – коэффициент полного пропускания в текущий момент времени t (после аппликации ОПА). Из рис. 19в хорошо видно, что эффективность ОПТ выше 100% для всего спектрального диапазона от 200 до 800 нм, и является максимальной для УФ-области, где она достигает

почти 3500% за счет очень малого начального пропускания из-за сильного рассеяния света в этой области и высокой чувствительности приведенного коэффициента рассеяния к изменению показателя преломления среды, окружающей рассеиватели (см. уравнение (10)).

Если в слизистой оболочке десен были идентифицированы три виртуальных «оптических окна» (200–250 нм, 250–300 нм и 300–400 нм) (рис. 19б), которые были успешно использованы для повышения эффективности УФ-терапии [316], то ОПТ с помощью глицерина позволило обнаружить два «оптических окна» в УФ-области для слизистой оболочки толстой кишки (200–260 нм и 260–418 нм), что было использовано для идентификации патологической ткани [307, 309]. В последнем примере, два длинноволновых окна прозрачности слились в одно большое окно, по-

скольку прозрачность ткани оказалась более высокой, чем в первом примере.

Таким образом, технология оптического просветления с использованием биологически совместимых агентов позволяет увеличить выход слабой люминесценции из глубины ткани, что недавно было продемонстрировано *in vivo* для мышей при детектировании флуоресценции опухолевых клеток [317]. В то же время в отношении ССС биологические ткани — это не пассивные среды, пропускающие фотоны, сгенерированные извне, а «активные участники» процесса. Как известно, генерация ССС — свободно-радикальный процесс, сопряженный с перекисным окислением липидов, аминокислот и других биологических молекул, и изменение состава окружающей среды может значительно влиять на его протекание. Однако это не означает невозможность использования таких технологий, а только необходимость соблюдать осторожность в интерпретации получаемых результатов. В этом смысле данная методика аналогична любым другим подходам, модифицирующим спонтанное ССС: фото- или хемииндуцированной люминесценции, активированной люминесценции и т.д. В каждом из этих случаев ССС, регистрируемое от системы, не является ее спонтанным «природным» продуктом и потому требует специальных подходов в интерпретации. В то же время все эти подходы позволяют получить много дополнительной ценной информации об исследуемой системе, которую не может дать регистрация только спонтанного излучения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время область техники детектирования сверхслабых излучений, в том числе с пространственным, временным и спектральным разрешением, активно развивается в связи с необходимостью решения задач биомедицинской, военной и космической техники. Близкие задачи детектирования и 2D-визуализации сверхслабых оптических излучений в широком спектральном диапазоне ставятся при разработке техники астрофизических исследований, при этом отличием от исследований ССС является то, что регистрируются направленные излучения. Ожидается, что разработанные для астрофизических исследований матрицы детекторов на кинетической индуктивности (Microwave Kinetic Inductance Detector, MKID) [321, 322] в 2020-х годах заменят твердотельные матрицы в этой области [323], перспективны они и для применения в области исследований ССС. Кроме детекторов на кинетической индуктивности в области исследований ССС перспективно применение и других типов сверхпроводниковых детекторов, например, нанопроволочных однофотонных детекторов (superconducting nanowire single photon detector,

SNSPD) [324, 325], а также однофотонных детекторов с использованием других низкоразмерных материалов [326–328]. Можно ожидать, что для пространственно-временных и полихроматических спектральных исследований ССС биологических объектов в ближайшее время будут более активно использоваться также CCD-камеры с электронным умножением (EMCCD), а дальнейшее совершенствование технических характеристик CMOS-камер позволит использовать для исследований ССС также и эти устройства. Элементы, способные регистрировать перенос одного электрона [329], перспективны для исследования сверхслабых излучений [327], поскольку они исключают необходимость усиления потока электронов (например, в ФЭУ) или длительного накопления заряда (в CCD), что должно снизить шумы и улучшить временные характеристики счетчиков фотонов.

Область исследований ССС видимого, ближнего ИК- и ближнего УФ-диапазонов хорошо развита: основные механизмы и каскады реакций уже вполне изучены, методы исследований описаны в учебниках, ведутся активные научные работы, как в фундаментального, так и прикладного характера. Экспериментальные методы исследования продолжают развиваться по мере совершенствования техники, методов анализа сигналов, развития теоретических знаний. Методики, основанные на исследованиях ССС в этом диапазоне, уже нашли целый ряд практических применений [330–333], некоторые используются уже несколько десятилетий в медицинских и исследовательских лабораториях [334], значительное количество находятся на этапе внедрения. В связи с этим парадоксальным представляется состояние исследований ССС в среднем ультрафиолетовом, т.е. в том диапазоне, с которого началось развитие всего научного направления (первые 25 лет все работы по тематике ССС велись только в области среднего УФ-диапазона). За последние несколько десятилетий предпринимались только единичные попытки исследовать УФ-компоненту ССС биологических объектов [335], и сведения о ней остались практически на уровне 1940-х годов. Отношение к исследованиям ССС «митогенетического» периода неоднозначно, и в массовом сознании они часто ассоциируются с «лженаукой» (см. ч. 1 данного обзора [16]). Вместе с тем результаты исследований ССС «митогенетического» периода не опровергнуты, но и не доказаны, они могут и должны быть проверены с использованием арсенала современной науки. Эти исследования охватывали ряд важнейших фундаментальных проблем биологии и медицины, сохранивших актуальность и в настоящее время, таких как причины деления клетки, процессы канцерогенеза и др. [64, 283, 336, 337]. Из прикладных результатов представляет значитель-

ный интерес проверка метода онкодиагностики, основанной на исследованиях ССС в среднем УФ-диапазоне, и идентификация заявленного универсального пептидного онкомаркера крови, тушащего хемилюминесценцию крови (согласно клиническим данным 1940-х годов специфичность и чувствительность онкодиагностики превышали 95%) [338–342]. Это востребовано для ранней онкодиагностики, оценки эффективности проведенной онкотерапии и своевременного обнаружения метастазов. Появившиеся технические возможности детектирования сверхслабых излучений среднего УФ диапазона (например, высокочувствительные малошумящие солнечно-слепые ФЭУ) позволяют выполнить однозначную проверку большого комплекса результатов исследований ССС, полученных с помощью биологических детекторов. Развитие техники и методов исследования ССС в среднем УФ и современную проверку результатов «митогенетического» периода мы полагаем одним из наиболее важных и перспективных направлений в области исследований ССС.

БЛАГОДАРНОСТИ

Для обзора ранних работ по ССС был использован уникальный архив научных публикаций, собранный А.Г. Гурвичем, его женой Л.Д. Гурвич, дочерью А.А. Гурвич и внуком Л.В. Белоусовым, за что авторы выражают благодарность их наследникам.

Авторы выражают глубокую признательность А.А. Красновскому мл. за бесценные советы, справедливую критику и правку текста статьи, а также выражают благодарность М.Б. Барнякову за полезные замечания и дополнения, касающиеся счетчиков фотонов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 20-12-50328.

Исследования ВВТ были также поддержаны в рамках гранта 13.2251.21.0009 Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (075-15-2021-942).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАР-ТОВ

Настоящая работа не содержит описания исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. И. В. Володяев, Л. В. Белоусов, И. И. Концевая и др., Биофизика **66** (6), 1082 (2021).
2. W. Stempell, Biologisches Zentralblatt **9**, 607 (1929).
3. W. Stempell and G. V. Romberg, Protoplasma **13** (1), 28 (1931).
4. W. Stempell, *Die unsichtbare Strahlung der Lebewesen (Mitogenetische oder Organismenstrahlung)*. (Verlag von Gustav Fischer, Jena, 1932).
5. M. Heinemann, Nature **134**, 701 (1934).
6. M. Heinemann, Acta Brevia Nederland. **5**, 15 (1935).
7. W. Stempell, Protoplasma **12**, 538 (1931).
8. L. Petri and R. C. Accad, Lincei Ser. VI **7**, 891 (1928).
9. J. Magrou, Compt. Rend. Acad. Sci. (Paris) **190**, 84 (1930).
10. G. W. Taylor and E. N. Harvey, Biolog. Bull. **61** (3), 280 (1931).
11. B. Rajewsky, in *Zehn Jahre Forschung auf dem physikalisch-medizinischen Grenzgebiet*, ed. by F. Dessauer (Georg Thieme Verlag, Leipzig, 1931), pp. 244–257.
12. G. Frank and S. Rodionow, Biochemische Zeitschrift **249** (4/6), 323 (1932).
13. H. Barth, Biochemische Zeitschrift **285**, 311 (1936).
14. L. Grebe, A. Krost, and L. Peukert, Strahlenther Onkol. **60**, 538 (1937).
15. Р. Одюбер, Успехи химии **7** (12), 1858 (1938).
16. Е. В. Наумова, Ю. А. Владимиров, Л. В. Белоусов и др., Биофизика **66** (5), 900 (2021).
17. Л. В. Белоусов, В. Л. Воейков и Ф.-А. Попп, Природа, № 3, 64 (1997).
18. V. L. Voeikov and L. V. Belousov, in *Biophotonics and Coherent Systems in Biology* (Springer US, Boston, MA, 2007), pp. 1–16.
19. I. V. Volodyaev and L. V. Belousov, Front. Physiol. **6** (00241), 1 (2015).
20. E. V. Naumova, A. E. Naumova, D. A. Isaev, and I. V. Volodyaev, J. Biomed. Photonics & Engineering **4** (4), 040201 (2018).
21. L. Colli and U. Facchini, Il Nuovo Cimento **12** (1), 150 (1954).
22. L. Colli, U. Facchini, G. Guidotti, et al., Experientia **11** (12), 479 (1955).
23. Ю. А. Владимиров, *Сверхслабые свечения при биохимических реакциях* (Наука, М., 1966).
24. Б. Н. Тарусов, И. И. Иванов и Ю. М. Петрусевиц, *Сверхслабое свечение биологических систем*. (Изд-во МГУ, М., 1967).
25. Ю. А. Владимиров и Е. В. Проскурнина, Успехи биол. химии **49**, 341 (2009).
26. V. L. Voeikov, Riv. Biol. **103** (2–3), 321 (2010).
27. M. Cifra and P. Pospisil, J. Photochem. Photobiol. B, Biology **139**, 2 (2014).
28. S. Cova, M. Ghioni, A. Lacaita, et al., Appl. Optics **35** (12), 1956 (1996).

29. T. Isoshima, Y. Isojima, K. Nakomori, et al., *Rev. Sci. Instrum.* **66** (4), 2922 (1995).
30. Y. Isojima, T. Isoshima, K. Nagai, et al., *Neuroreport* **6** (4), 658 (1995).
31. Y. P. Chen, Y. J. Liu, X. L. Wang, et al., *J. Integr. Plant Biol.* **47** (7), 849 (2005).
32. C. Bruschini, H. Homulle, I. M. Antolovic, et al., *Light, Science & Applications* **8**, 87 (2019).
33. F. Ceccarelli, G. Acconcia, A. Gulinatti, et al., *Adv. Quantum Technol.* **4** (2), 2000102 (2021).
34. R. K. Henderson, N. Johnston, F. M. D. Rocca, et al., *IEEE J. Solid State Circuits* **54** (7), 1907 (2019).
35. *Photomultiplier tubes: Basics and applications*, 4th ed. (Hamamatsu Photonics, 2017).
36. В. Л. Воейков и И. В. Баскаков, *Доклады РАН* **334**, 234 (1994).
37. А. П. Бойченко, *Журн. научной и прикладной фотографии* **46** (6), 48 (2001).
38. А. П. Бойченко, в сб. *Тезисы IV Международного конгресса «Слабые и сверхслабые поля и излучения в биологии и медицине»* (2006), с. 84.
39. А. П. Бойченко, *Экологич. вестн. научных центров ЧЭС* **8** (4), 5 (2011).
40. А. П. Бойченко, *Технологии живых систем* **5** (1), 72 (2008).
41. L. Colli, U. Facchini, and A. Rossi, *Nuovo Cimento* **11** (3), 255 (1954).
42. B. L. Strehler and W. Arnold, *J. Gen. Physiol.* **34** (6), 809 (1951).
43. M. Takeda, M. Kobayashi, M. Takayama, et al., *Cancer Sci.* **95** (8), 656 (2004).
44. M. Kobayashi, *J. Photochem. Photobiol. B* **139**, 34 (2014).
45. M. Kobayashi, T. Iwasa, and M. Tada, *J. Photochem. Photobiol. B* **159**, 186 (2016).
46. F. Ortega-Ojeda, M. Calcerrada, A. Ferrero, et al., *Sensors (Basel)* **18** (4) (2018).
47. R. Van Wijk, E. P. A. Van Wijk, Y. Schroen, and J. van der Greef, **15**, 27 (2013).
48. W. L. Chen, D. Xing, S. Tan, et al., *Luminescence* **18** (1), 37 (2003).
49. D. Xing, S. C. Tan, Y. H. Tang, et al., *Chinese Sci. Bull.* **44** (23), 2159 (1999).
50. Ю. А. Владимиров и Ф. Ф. Литвин, *Биофизика* **4** (5), 601 (1959).
51. S. Tudisco, F. Musumeci, A. Scordino, and G. Privitera, *Rev. Sci. Instrum.* **74** (10), 4485 (2003).
52. L. Lanzano, A. Scordino, S. Privitera, et al., *Eur. Biophys. J.* **36** (7), 823 (2007).
53. H. J. Niggli, S. Tudisco, G. Privitera, et al., *J. Biomed. Opt.* **10** (2), 024006 (2005).
54. Ю. А. Владимиров и Ф. Ф. Литвин, *Биофизика* **3** (5), 606 (1958).
55. Р. Ф. Васильев, О. Н. Карпунин и В. Я. Шляпин-тох, *Журн. физ. хим.* **35**, 461 (1961).
56. Б. Н. Тарусов, А. И. Поливода и А. И. Журавлев, *Биофизика* **6** (4), 490 (1961).
57. Б. Н. Тарусов, А. Н. Поливода и А. И. Журавлев, *Радиобиология* **1** (1), 150 (1961).
58. Р. Ф. Васильев, О. И. Карпунин и В. Я. Шляпин-тох, *Докл. АН СССР* **125** (1), 106 (1959).
59. А. И. Журавлев, *Квантовая биофизика животных и человека: Учеб. пособие* (Бином, М., 2015).
60. Ю. А. Закотеев, *Хемилюминесценция. Принципы и методики регистрации, оборудование, задачи* (Москва, 2015).
61. P. Madl, in *Fields of the Cell*, Ed. by D. Fels, M. Cifra, and F. Scholkmann (Research Signpost, Kerala, India, 2015), pp. 55–69.
62. A. Potozky, *Biologischen Zentralblatt* **50**, 712 (1930).
63. A. Potozky, *Biologischen Zentralblatt* **52** (3), 9 (1932).
64. А. Г. Гурвич и Л. Д. Гурвич, *Введение в учение о митогенезе* (Изд-во Акад. мед. наук СССР, М., 1948).
65. R. Hagens, F. Khabiri, V. Schreiner, et al., *Skin Res. Technol.* **14** (1), 112 (2008).
66. B. Rajewsky, *Strahlenther Onkol.* **39**, 194 (1930).
67. B. Rajewsky, *Zeits. f. Physik* **63**, 576 (1930).
68. H. Geiger and W. Müller, *Die Naturwissenschaften* **16** (31), 617 (1928).
69. H. Geiger and W. Müller, *Physikalische Zeitschrift* **29**, 839 (1928).
70. O. Rahn, *Invisible radiations of organisms* (Gebrüder Bornträger, Berlin, 1936).
71. F. Dessauer, *Archiv für exper. Zellforschung, besonders Gewebezüchtung* **11**, 37 (1931).
72. W. Gerlach, *Sitzungsber. Ges. Morphol. und Physiol. (München)* **42**, 1 (1933).
73. H. Barth, *Arch. Biol. Sci. Ser B* **35** (1), 29 (1934).
74. A. Hollaender and W. D. Claus, *J. Optic. Soc. Amer.* **25**, 270 (1935).
75. B. Rajewsky, *Zeitschrift für Krebsforschung* **35** (1), 387 (1932).
76. H. Schreiber and W. Friedrich, *Biochem. Zeitsch.* (227), 386 (1930).
77. G. Frank and S. Rodionow, *Die Naturwissenschaften* **19** (30), 659 (1931).
78. С. Родионов и Г. М. Франк, *Вопросы свето-биологии и измерения света* (Гос. техн.-теорет. изд-во, М.-Л., 1934).
79. С. Родионов и Г. М. Франк, *Архив биол. наук, сер. Б* **35** (1), 277 (1934).
80. G. Locher, *Phys. Rev.* **42**, 525 (1932).
81. F. Seyfert, *Jahrb. Wiss. Bot.* (76), 747 (1932).
82. R. Audubert and V. Doormaal, *Comptes Rendus des Sciences* **196**, 1883 (1933).
83. W. W. Siebert and H. Seffert, *Naturwissenschaften* **21** (9), 193 (1933).
84. J. Gray and C. Ouellet, *Proc. Roy. Soc. Lond. Ser. B* **114** (786), 1 (1933).
85. E. Lorenz, *J. Gen. Physiol.* **17** (6), 843 (1934).

86. K. H. Kreuchen and J. B. Bateman, *Protoplasma* **22** (1), 243 (1934).
87. Г. Барт, *Архив биол. наук* **46** (1), 153 (1937).
88. E. Lorentz, *Phys. Rev.* (44), 329 (1929).
89. W. W. Siebert and H. Seffert, *Архив биол. наук* **35**, 177 (1934).
90. W. Siebert and H. Seffert, *Biochemische Zeitschrift* **287**, 92 (1936).
91. A. Hollaender and W. D. Claus, *An experimental study of the problem of mitogenetic radiation* (National Research Council of the National Academy of Sciences, Washington, 1937).
92. K. W. Haussert and K. H. Kreuchen, *Zeits. f. tech. Physik* **15**, 20 (1934).
93. M. W. Karev and S. F. Rodionov, *Zeits. f. Physik* **92** (615-621) (1934).
94. K. H. Reiss, *Zeits. f. Physik* **93** (411) (1935).
95. E. Lorenz, *Pub. Hlth. Rep.* **48**, 1311 (1933).
96. R. Audubert, *Trans. Faraday Soc.* **35** (213), 197 (1939).
97. J. B. Bateman, *Biol. Rev.* **10** (1), 42 (1935).
98. L. A. Kubetsky, *Proc. Institute of Radio Engineers* **25** (4), 421 (1937).
99. V. K. Zworykin, G. A. Morton, and L. Malter, *Proc. IRE* **24** (3), 351 (1936).
100. J. Rajchman and E. W. Pike, *RCA Technical Report TR-362* (September 9) (1937).
101. Г. Г. Шишкин, *Электроника*, 2-е изд., испр. и доп. ed. (Юрайт, Москва, 2017).
102. Н. С. Матвеева, *Дисс. ... канд. биол. наук* (МГУ, М., 2012).
103. G. A. Russell, *J. Amer. Chem. Soc.* **79** (14), 3871 (1957).
104. V. A. Belyakov and R. F. Vassil'ev, *Photochem. Photobiol.* **11** (3), 179 (1970).
105. J. A. Howard and K. U. Ingold, *J. Amer. Chem. Soc.* **90** (4), 1056 (1968).
106. R. E. Kellogg, *J. Amer. Chem. Soc.* **91** (20), 5433 (1969).
107. Р. Ф. Васильев, *Дисс. ... д-ра физ.-мат. наук* (ЛГУ им. А. А. Жданова, Л., 1963).
108. Р. Ф. Васильев, *Оптика и спектроскопия* **18** (2), 236 (1965).
109. Р. Ф. Васильев, *Оптика и спектроскопия* **18** (3), 415 (1965).
110. Р. Ф. Васильев, в *Биoluminesценция. Труды МО-ИП* (Наука, М., 1965), т. 21, сс. 198–202.
111. Р. Ф. Васильев и А. А. Вичутинский, *Докл. АН СССР* **145** (6), 1301 (1962).
112. Р. Ф. Васильев и А. А. Вичутинский, *Докл. АН СССР* **142** (3), 615 (1962).
113. Р. Ф. Васильев, А. А. Вичутинский и А. С. Черкасов, *Докл. АН СССР* **149** (1), 124 (1963).
114. Р. Ф. Васильев и А. А. Вичутинский, *Журн. физ. химии* **36** (8), 1799 (1962).
115. Р. Ф. Васильев и И. Ф. Русина, *Докл. АН СССР* **156** (6), 1402 (1964).
116. Р. Ф. Васильев и И. Ф. Русина, *Изв. АН СССР, сер. хим.* **9**, 1728 (1964).
117. R. F. Vasiljev, in *Progress in Reaction Kinetics* (Pergamon, New York, 1967), V. 4, p. 305.
118. Ю. А. Владимиров и А. И. Арчаков, *Перекисное окисление липидов в биологических мембранах* (Наука, М., 1972).
119. О. Н. Карпухин, В. Я. Шляпинтох, Н. В. Золотова и др., *Журн. физ. химии* **37**, 1636 (1963).
120. В. Я. Шляпинтох, О. Н. Карпухин, Л. М. Постников и др., *Хемилюминесцентные методы исследования медленных химических процессов* (Наука, М., 1966).
121. Ю. А. Владимиров, М. В. Корчагина и В. И. Оленев, *Биофизика* **16** (5), 952 (1971).
122. М. В. Корчагина и Ю. А. Владимиров, в сб. *Тезисы докл. Симп. «Свободнорадикальные состояния и их роль при лучевом поражении и злокачественном росте»* (М., 1971), с. 49.
123. Ю. А. Владимиров, Т. Б. Суслова, В. И. Оленев и З. П. Черемисина, в сб. *Митохондрии, биохимические функции в системе клеточных органелл*, под ред. С. Е. Северина (Наука, М., 1969), с. 203.
124. Ю. А. Владимиров, Е. В. Проскурнина, Д. Ю. Измайлов и др., *Источники и мишени свободных радикалов в крови человека* (МАКС Пресс, М., 2017).
125. Я. И. Серкиз, Е. Е. Чеботарев, В. А. Барабой и др., *Хемилюминесценция крови в экспериментальной и клинической онкологии* (Наук. думка, Киев, 1984).
126. А. И. Журавлев и А. И. Журавлева, *Сверхслабое свечение сыворотки крови и его значение в комплексной диагностике* (Медицина, М., 1975).
127. М. П. Шерстнев, *Дисс. ... д-ра мед. наук* (НИИ физико-химической медицины МЗ РФ, 1997).
128. М. Н. Молоденков и В. Н. Шилов, *Труды 2-го МОЛГМИ им. Н.И. Пирогова* **9** (8), 60 (1974).
129. А. П. Шаров, Ю. А. Владимиров, Ю. М. Лопухин и М. Н. Молоденков, *Труды 2 МОЛГМИ, сер. Хирургия*, № 8, 49 (1974).
130. А. П. Шаров, Ю. М. Лопухин, М. Н. Молоденков и Ю. А. Владимиров, в сб. *Тезисы докл. IV Международного биофизического конгресса* (Москва, 1972), с. 360.
131. Я. И. Серкиз, *Эксперим. онкология* **3** (3), 67 (1980).
132. A. Shanei, Z. Alinasab, A. Kiani, and M. A. Nematollahi, *J. Biomed. Phys. Eng.* **7** (4), 389 (2017).
133. F. Khabiri, R. Hagens, C. Smuda, et al., *Skin Res. Technol.* **14** (1), 103 (2008).
134. Ю. А. Владимиров, Ф. Ф. Литвин и Т. Мань-ци, *Биофизика* **7** (6), 675 (1962).
135. R. O. Recknagel and A. K. Ghoshal, *Lab. Invest.* **15**, 132 (1966).

136. Т. Б. Суслова, В. И. Оленев и Ю. А. Владимиров, *Биофизика* **13**, 723 (1968).
137. Ю. А. Владимиров, О. Ф. Львова и З. П. Черемисина, *Биохимия* **31** (3), 507 (1966).
138. Ю. А. Владимиров и О. Ф. Львова, *Биофизика* **9** (4), 506 (1964).
139. Ю. А. Владимиров и О. Ф. Львова, в сб. *Биофизика клетки*, под ред. Г. М. Франка (Наука, М., 1965), сс. 74–83.
140. О. Ф. Львова, Дисс. ... канд. мед. наук (1966).
141. О. Ф. Львова и Ю. А. Владимиров, *Труды МОИП* **16**, 214 (1966).
142. S. R. Forthney and W. S. Linn, *Arch. Biochem. Biophys.* **104** (2), 241 (1964).
143. P. Hochstein and L. Ernster, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **12**, 388 (1963).
144. P. Hochstein, K. Nordenbrand, and L. Ernster, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **14**, 323 (1964).
145. F. E. Hunter, Jr., J. M. Gebicki, P. E. Hoffsten, et al., *J. Biol. Chem.* **238** (2), 828 (1963).
146. F. E. Hunter, Jr., A. Scott, P. E. Hoffsten, et al., *J. Biol. Chem.* **239**, 604 (1964).
147. F. E. Hunter, Jr., A. Scott, J. Weinstein, and A. Schneider, *J. Biol. Chem.* **239**, 622 (1964).
148. E. H. Thiele and J. W. Huff, *Arch. Biochem. Biophys.* **88**, 203 (1960).
149. Ю. А. Владимиров, Т. Б. Суслова и В. И. Оленев, *Биофизика* **14** (5), 836 (1969).
150. Т. Б. Суслова, В. И. Оленев и Ю. А. Владимиров, *Биофизика* **14**, 510 (1969).
151. Ю. А. Владимиров, П. И. Гутенев и П. И. Кузнецов, *Биофизика* **18** (6), 1024 (1973).
152. Ю. А. Владимиров, *Соросовский образоват. журн.* **7** (1), 16 (2001).
153. Ю. А. Владимиров, З. П. Черемисина и Т. Б. Суслова, *Биофизика* **17** (4), 702 (1972).
154. A. J. Williams and P. J. Cole, *Thorax* **36** (11), 866 (1981).
155. V. L. Voeikov and C. N. Novikov, *SPIE Proc.* **3194**, 328 (1998).
156. Ю. А. Владимиров и М. П. Шерстнев, *Хемилюминесценция клеток животных* (М., 1989).
157. Ю. А. Владимиров и А. Я. Потапенко, *Физико-химические основы фотобиологических процессов: учебное пособие для медицинских и биологических спец. вузов* (Высш. школа, М., 1989).
158. Ю. А. Владимиров и М. П. Шерстнев, в сб. *Биофизические методы диагностики, Труды 2-го Московского Медицинского института* (М., 1990), сс. 3–40.
159. V. L. Voeikov, C. N. Novikov, and N. I. Siuch, *SPIE Proc.*, **2985**, 286 (1997).
160. C. N. Novikov, V. L. Voeikov, and F.-A. Popp, *Proc. Int. Conf. "Biophotonics. Non-equilibrium and Coherent Systems in Biology, Biophysics and Biotechnology"* (1995), p. 291.
161. V. L. Voeikov, R. Asfaramov, E. V. Bouravleva, et al., *Ind. J. Exp. Biol.* **43**, 473 (2003).
162. B. Gabriel and J. Teissie, *Eur J Biochem* **223** (1), 25 (1994).
163. B. S. Cheun, S. H. Yi, K. Y. Baik, et al., *J. Environ. Biol.* **28** (4), 735 (2007).
164. M. Bereta, M. Teplan, D. E. Chafai, et al., *Sci. Rep.* **11** (1), 328 (2021).
165. H. Sardarabadi, F. Zohrab, P. Vahalovac, and M. Cifra, in *Endogenous Biophotonics* (Springer, 2021), pp. (in print).
166. А. А. Красновский (мл.) и Ф. Ф. Литвин, *ДАН СССР* **173** (2), 451 (1967).
167. А. Н. Теренин, *Фотохимия красителей и родственных органических соединений* (Гостехиздат, М.-Л., 1947).
168. А. Н. Теренин, *Фотоника молекул красителей и родственных органических соединений* (Наука, Л., 1967).
169. C. A. Parker and T. A. Joyce, *Photochem. Photobiol.* **6** (6), 395 (1967).
170. А. А. Красновский (мл.), В. А. Шувалов, Ф. Ф. Литвин и А. А. Красновский (старший), *ДАН СССР* **199**, 1181 (1971).
171. А. А. Красновский (мл.), В. А. Романюк и Ф. Ф. Литвин, *ДАН СССР* **209** (4), 965 (1973).
172. А. А. Красновский (мл.) и Ф. Ф. Литвин, *Изв. АН СССР. Сер. физ.* **39** (9), 1968 (1975).
173. N. N. Lebedev, Y. Naus, and A. A. Krasnovsky Jr., *Biophysics* **21** (2), 382 (1976).
174. A. A. Krasnovsky, *Photochem Photobiol* **36** (6), 733 (1982).
175. А. А. Красновский (мл.) и Ю. В. Ковалев, *Биохимия* **79** (4), 443 (2014).
176. A. A. Krasnovsky (Jr), in *Handbook of Porphyrin Science with Applications to Chemistry, Physics, Materials Science, Engineering, Biology and Medicine*, Ed. by K. M. Kadish, K. M. Smith, and R. Guillard (World Sci. Publ., Singapore, 2014), V. 33, pp. 77–165.
177. А. А. Красновский (мл.) и Ф. Ф. Литвин, *Молекуляр. биология* **1** (5), 712 (1967).
178. А. А. Красновский (мл.) и М. Г. Шапошникова, *Молекуляр. биология* **8** (5), 666 (1974).
179. A. A. Krasnovsky (Jr) and F. F. Litvin, *Photochem. Photobiol.* **20**, 133 (1974).
180. A. A. Krasnovsky, *Acta Phys. Chem.* **23** (1), 147 (1977).
181. А. А. Красновский (мл.) и Е. А. Венедиктов, *Биофизика* **23** (2), 387 (1978).
182. А. А. Красновский (мл.), *Биофизика* **21** (4), 748 (1976).
183. А. А. Красновский (мл.), *Биофизика* **22** (5), 927 (1977).
184. A. A. Krasnovsky Jr., *Photochem. Photobiol.* **29** (1), 29 (1979).

185. A. A. Krasnovsky Jr. and K. V. Neverov, *SPIE Proc.* **1890**, 56 (1993).
186. A. A. Krasnovsky, *J. Photochem. Photobiol. A* **196** (2–3), 210 (2008).
187. А. А. Красновский (мл.) и К. В. Неверов, *Биофизика* **55** (3), 349 (2010).
188. S. J. Arnold, E. A. Ogryzlo, and H. Witzke, *J. Chem. Phys.* **40** (6), 1769 (1964).
189. K. Furukawa, E. W. Gray, and E. A. Ogryzlo, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **171** (1), 175 (1970).
190. A. U. Khan and M. Kasha, *J. Amer. Chem. Soc.* **88** (7), 1574 (1966).
191. A. U. Khan, *Science* **168** (3930), 476 (1970).
192. A. U. Khan, P. Gebauer, and L. P. Hager, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **80** (17), 5195 (1983).
193. A. A. Krasnovsky Jr and K. V. Neverov, *Chem. Phys. Lett.* **167** (6), 591 (1990).
194. В. М. Ширяев, И. Б. Федорович, И. И. Сапежинский и др., *Биофизика* **25** (3), 439 (1980).
195. Г. Г. Борисенко, А. Н. Осипов, К. Д. Казаринов и Ю. А. Владимиров, *Биохимия* **62**, 774 (1997).
196. Ю. А. Владимиров и Д. И. Рощупкин, в сб. *Тез. докл. XI Совещания по люминесценции «Молекулярная люминесценция и люминесцентный анализ»* (АН СССР, М., 1962), p. 16.
197. H. J. Niggli, S. Tudisco, G. Privitera, et al., *Laser-ultraviolet-a induced biophotonic emission in cultured mammalian cells* (Springer, New York, 2005).
198. A. Scordino, F. Musumeci, M. Gulino, et al., *J. Phys. D* **41** (15), 155507 (2008).
199. R. Grasso, M. Gulino, A. Scordino, et al., in *SPIE Proc.*, Ed. by J. Popp, V. V. Tuchin, D. L. Matthews, and F. S. Pavone (2016), Vol. 9887, pp. 988723.
200. A. Scordino, I. Baran, M. Gulino, et al., *J. Photochem. Photobiol. B: Biology* **139**, 76 (2014).
201. A. Scordino, A. Campisi, R. Grasso, et al., *J. Biomed. Opt.* **19** (11), 117005 (2014).
202. I. Baran, C. Ganea, S. Privitera, et al., *Oxidative medicine and cellular longevity*, 498914 (2012).
203. R. Grasso, M. Gulino, F. Giuffrida, et al., *J. Photochem. Photobiol. B: Biology* **187**, 126 (2018).
204. R. Grasso, R. Pellitteri, F. Musumeci, et al., *Clinical and Preclinical Optical Diagnostics II*, Munich, 11075 (2019).
205. F. Musumeci, L. A. Applegate, G. Privitera, et al., *J. Photochem. Photobiol. B* **79** (2), 93 (2005).
206. F. Musumeci, G. Privitera, A. Scordino, et al., *Appl. Phys. Lett.* **86** (15), 153902 (2005).
207. W. Scholz, U. Staszkievicz, F. A. Popp, and W. Nagl, *Cell Biophys.* **13** (1), 55 (1988).
208. F. A. Popp and Y. Yan, *Phys. Lett. A* **293** (1–2), 93 (2002).
209. P. Jursinic, in *Light Emission by Plants and Bacteria*, Ed. by I. Govindjee, J. Ames, and D. C. Fork (Acad. Press, New York, 1986), pp. 291–328.
210. A. Triglia, G. Malfa, F. Musumeci, et al., *J. Food Sci.* **63** (3), 512 (1998).
211. R. Van Wijk, A. Scordino, A. Triglia, and F. Musumeci, *J. Photochem. Photobiol. B: Biology* **49** (2), 142 (1999).
212. T. Esmailpour, E. Fereydouni, F. Dehghani, et al., *Sci. Rep.* **10** (1), 463 (2020).
213. M. Hossu, L. Ma, X. Zou, and W. Chen, *Cancer Nanotechnol.* **4** (1–3), 21 (2013).
214. M. Hossu, L. Ma, and W. Chen, *J. Photochem. Photobiol. B* **99** (1), 44 (2010).
215. H. Sardarabadi, D. E. Chafai, F. Gheybi, et al., *J. Photochem. Photobiol. B: Biology* **204**, 111812 (2020).
216. R. Van Wijk, M. Kobayashi, and E. P. A. Van Wijk, *J. Photochem. Photobiol. B: Biology* **83** (1), 69 (2006).
217. *Электронный ресурс*: https://en.wikipedia.org/wiki/Microchannel_plate_detector#/media/File:Mcp-de.svg.
218. J.-P. Boutot and G. Pietri, *IEEE Trans. Electron Dev.* **17** (7), 493 (1970).
219. G. Eschard and R. Polaert, *Tech. Philips* (January/February 1969), 40 (1969).
220. Y. Tsuchiya, E. Inuzuka, T. Kurono, and M. Hosoda, in *Proc. Eighth Symp. on Photo-Electronic Image Devices* (1986), pp. 21–31.
221. T. Gys, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment* **787**, 254 (2015).
222. M. Lampton, *Sci. American* **245** (5), 62 (1981).
223. É. Hideg, R. Q. Scott, and H. Inaba, *FEBS Lett.* **250** (2), 275 (1989).
224. R. Q. Scott, M. Usa, and H. Inaba, *Appl. Phys. B* **48** (2), 183 (1989).
225. T. Ichimura, M. Hiramatsu, N. Hirai, and T. Hayakawa, *Photochem. Photobiol.* **50** (3), 283 (1989).
226. M. Kobayashi, B. Devaraj, M. Usa, et al., *Front. Med. Biol. Engineer.* **7** (4), 299 (1996).
227. R. Q. Scott and H. Inaba, *J. Biolumin. Chemilumin.* **4** (1), 507 (1989).
228. S. Suzuki, M. Usa, T. Nagoshi, et al., *J. Photochem. Photobiol. B: Biology* **9** (2), 211 (1991).
229. T. Amano, M. Kobayashi, B. Devaraj, et al., *Urol. Res.* **23** (5), 315 (1995).
230. M. Kobayashi, M. Takeda, T. Sato, et al., *Neurosci. Res.* **34** (2), 103 (1999).
231. M. Kobayashi, M. Takeda, K. I. Ito, et al., *J. Neurosci. Methods* **93** (2), 163 (1999).
232. M. Kobayashi, K. Sasaki, M. Enomoto, and Y. Ehara, *J. Exp. Bot.* **58** (3), 465 (2007).
233. M. Kobayashi, B. Devaraj, M. Usa, et al., *Photochem. Photobiol.* **65** (3), 535 (1997).
234. Z. Wang, N. Wang, Z. Li, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **113** (31), 8753 (2016).
235. L. Chen, Z. Wang, and J. Dai, *Brain Res.* **1749**, 147133 (2020).

236. I. Khaoua, G. Graciani, A. Kim, and F. Amblard, *Sci. Rep.* **11** (1), 3530 (2021).
237. В. П. Челибанов, Л. Н. Исаев и Г. Г. Ишанин, *Вестн. ЛИТМО* **6** (64), 14 (2009).
238. A. Prasad and P. Pospisil, *Sci. Rep.* **3**, 1211 (2013).
239. M. Kobayashi, *Biophotonics: Optical Science and Engineering for the 21st Century*, 155 (2005).
240. S. Usui, M. Tada, and M. Kobayashi, *Sci. Rep.* **9** (1), 8576 (2019).
241. E. van Wijk, M. Kobayashi, R. van Wijk, and J. van der Greef, *PloS One* **8** (12), e84579 (2013).
242. M. Kobayashi, D. Kikuchi, and H. Okamura, *PloS One* **4** (7), e6256 (2009).
243. K. Tsuchida and M. Kobayashi, *Sci. Rep.* **10** (1), 9626 (2020).
244. T. Iwasa and M. Kobayashi, *CLEO Pacific Rim Conf., Hong Kong*, W3A.131 (2018).
245. K. Tsuchida, T. Iwasa, and M. Kobayashi, *J. Photochem. Photobiol. B. Biology* **198**, 111562 (2019).
246. A. Prasad and P. Pospisil, *J. Biophotonics* **4** (11–12), 840 (2011).
247. H. Ou-Yang, *J. Photochem. Photobiol. B. Biology* **139**, 63 (2014).
248. A. G. Gurwitsch and L. D. Gurwitsch, *Nature* **143** (3633), 1022 (1939).
249. А. Гурвич, Л. Д. Гурвич и А. А. Слюсарев, *Архив биол. наук* **55** (2), 104 (1939).
250. T. Nagoshi, N. Watanabe, S. Suzuki, et al., *Photochem. Photobiol.* **56** (1), 89 (1992).
251. M. Tada, *Free Radic. Biol. Med.* **112**, 64 (2017).
252. T. Reiter and D. Gabor, *Zellteilung und Strahlung* (Springer-Verlag, Berlin, 1928).
253. G. Frank, *Biologisches Zentralblatt* **49**, 129 (1929).
254. J. Ponomarewa, *Biochemische Zeitschrift* **239**, 424 (1931).
255. G. Decker, *Protoplasma* **25** (1), 515 (1936).
256. А. Е. Браунштейн и А. П. Потockая, *Архив биол. наук, Сер. Б* **35** (1), 73 (1934).
257. M. Kobayashi, *Trends Photochem. Photobiol.* **10**, 111 (2003).
258. E. P. A. Van Wijk and R. Van Wijk, *Compl. Med. Res.* **12** (2), 96 (2005).
259. A. Boveris, R. A. Sanchez, A. I. Varsavsky, and E. Cadenas, *FEBS Lett.* **113**, 29 (1980).
260. A. Boveris, A. I. Varsavsky, S. G. d. Silva, and R. A. Sanchez, *Photochem. Photobiol.* **38**, 99 (1983).
261. E. Cadenas, I. D. Arad, A. Boveris, et al., *FEBS Lett.* **111** (2), 413 (1980).
262. M. Takeda, Y. Tanno, M. Kobayashi, et al., *Cancer Lett.* **127** (1–2), 155 (1998).
263. H. Inaba, Y. Shimizu, Y. Tsuji, and A. Yamaguchi, *Photochem. Photobiol.* **30** (1), 169 (1979).
264. F. A. Popp, *Biophotonen: Ein neuer Weg zur Lösung des Krebsproblems, Bd. 6* (Verlag für Medizin Dr. Ewald Fischer, Heidelberg, 1976).
265. F. A. Popp, B. Ruth, W. Bahr, et al., *Collective Phenomena* **3**, 187 (1981).
266. F. A. Popp and K. H. Li, *Int. J. Theor. Phys.* **32** (9), 1573 (1993).
267. R. P. Bajpai, *J. Theor. Biol.* **198** (3), 287 (1999).
268. F. A. Popp, J. J. Chang, A. Herzog, et al., *Phys Lett A* **293** (1–2), 98 (2002).
269. O. Kučera and M. Cifra, *Cell Commun. Signal.* **11**, 87 (2013).
270. S. N. Mayburov and I. V. Volodyaev, in *Proc. of Progress in Electromagnetics Res. Symp.* (Moscow, 2009), p. 1937.
271. M. Cifra, C. Brouder, M. Nerudova, and O. Kucera, *J. Lumin.* **164**, 38 (2015).
272. Л. В. Белоусов, А. Б. Бурлаков и Н. Н. Лучинская, *Онтогенез* **33** (3), 213 (2002).
273. Л. В. Белоусов, А. Б. Бурлаков и Н. Н. Лучинская, *Онтогенез* **34** (6), 453 (2003).
274. Л. В. Белоусов, Ф. А. Попп и Н. И. Казакова, *Онтогенез* **28** (5), 377 (1997).
275. M. Kobayashi and H. Inaba, *Appl. Optics* **39** (1), 183 (2000).
276. X. Shen, F. Liu, and X. Y. Li, *Experientia* **49** (4), 291 (1993).
277. N. Rafieiolhosseini, M. Poplová, P. Sasanpour, et al., *J. Photochem. Photobiol. B. Biology* **162**, 50 (2016).
278. F. Scholkmann, M. Cifra, T. A. Moraes, and C. de Mello Gallep, *J. Physics: Conf. Ser.* **329**, 012020 (2011).
279. H. Saeidfirozeh, A. Shafiekhani, M. Cifra, and A. A. Masoudi, *Sci. Rep.* **8** (1), 16231 (2018).
280. R. Van Wijk, E. P. A. Van Wijk, and R. P. Bajpai, *J. Photochem. Photobiol. B. Biology* **84** (1), 46 (2006).
281. E. P. Van Wijk, R. V. Wijk, R. P. Bajpai, and J. van der Greef, *J. Photochem. Photobiol. B. Biology* **99** (3), 133 (2010).
282. M. D. Williams and B. Chance, *J. Biol. Chem.* **258** (6), 3628 (1983).
283. А. Г. Гурвич и Л. Д. Гурвич, *Митогенетическое излучение* (Изд. ВИЭМ, Л., 1934).
284. J.-J. Chang, *Ind. J. Exp. Biol.* **46**, 371 (2008).
285. S. N. Mayburov, *EPJ Web of Conferences* **95**, 03024 (2015).
286. M. Kobayashi, B. Devaraj, and H. Inaba, *Phys. Rev. E* **57** (2), 2129 (1998).
287. V. V. Tuchin, *Tissue Optics: Light Scattering Methods and Instruments for Medical Diagnostics, Third Edition* (SPIE PRESS, Bellingham, 2015).
288. H. Liu, B. Beauvoit, M. Kimura, and B. Chance, *J. Biomed. Opt.* **1** (2), 200 (1996).
289. V. V. Tuchin, I. L. Maksimova, D. A. Zimnyakov, et al., *J. Biomed. Opt.* **2** (4), 401 (1997).
290. G. Vargas, K. F. Chan, S. L. Thomsen, and A. J. Welch, *Lasers in Surgery and Medicine* **29** (3), 213 (2001).

291. A. T. Yeh, B. Choi, J. S. Nelson, and B. J. Tromberg, *J. Invest. Dermatol.* **121** (6), 1332 (2003).
292. V. V. Tuchin, *Optical Clearing of Tissues and Blood* (SPIE PRESS, Bellingham, 2005).
293. K. Moulton, F. Lovell, E. Williams, et al., *J. Biomed. Opt.* **11** (5), 054027 (2006).
294. E. A. Genina, A. N. Bashkatov, and V. V. Tuchin, *Expert Rev. Med. Devices* **7** (6), 825 (2010).
295. X. Wen, Z. Mao, Z. Han, et al., *J. Biophotonics* **3** (1–2), 44 (2010).
296. T. Yu, X. Wen, V. V. Tuchin, et al., *J. Biomed. Opt.* **16** (9), 095002 (2011).
297. D. Zhu, K. V. Larin, Q. Luo, and V. V. Tuchin, *Laser Photon. Rev.* **7** (5), 732 (2013).
298. V. Hovhannisyan, P. S. Hu, S. J. Chen, et al., *J. Biomed. Opt.* **18** (4), 046004 (2013).
299. V. Marx, *Nat. Methods* **11** (12), 1209 (2014).
300. D. S. Richardson and J. W. Lichtman, *Cell* **162** (2), 246 (2015).
301. V. V. Tuchin, *J. Biomed. Photonics Eng.* **2**, 030201 (2016).
302. A. Y. Sdobnov, V. V. Tuchin, J. Lademann, and M. E. Darvin, *J. Phys. D. Appl. Phys.* **50**, 285401 (2017).
303. A. Sdobnov, M. E. Darvin, J. Lademann, and V. Tuchin, *J. Biophotonics* **10** (9), 1115 (2017).
304. Y. Alexandrovskaya, K. Sadovnikov, A. Sharov, et al., *J. Biophotonics* **11** (2), e201700105 (2018).
305. A. N. Bashkatov, K. V. Berezin, K. N. Dvoretzkiy, et al., *J. Biomed. Opt.* **23** (9), 1 (2018).
306. L. M. C. Oliveira and V. V. Tuchin, *The Optical Clearing Method: A New Tool for Clinical Practice and Biomedical Engineering* (Springer Nature, Switzerland AG, Cham, 2019).
307. I. Carneiro, S. Carvalho, R. Henrique, et al., *J. Biophotonics* **12** (12), e201900181 (2019).
308. I. Costantini, R. Cicchi, L. Silvestri, et al., *Biomed. Opt. Express* **10** (10), 5251 (2019).
309. I. Carneiro, S. Carvalho, R. Henrique, et al., *IEEE J. Sel. Top. Quant.* **27** (4), 1 (2021).
310. Q. Lin, E. N. Lazareva, V. I. Kochubey, et al., *Laser Phys. Lett.* **17** (10), 105601 (2020).
311. A. Y. Sdobnov, M. E. Darvin, E. A. Genina, et al., *Spectrochim. Acta. Part A, Mol. Biomol. Spectroscopy* **197**, 216 (2018).
312. P. Matryba, L. Kaczmarek, and J. Gołab, *Laser Photon. Rev.* **13** (8), 1800292 (2019).
313. K. Tainaka, T. C. Murakami, E. A. Susaki, et al., *Cell Reports* **24** (8), 2196 (2018).
314. K. Matsumoto, T. T. Mitani, S. A. Horiguchi, et al., *Nat. Protoc.* **14** (12), 3506 (2019).
315. M. V. Gómez-Gaviro, D. Sanderson, J. Ripoll, and M. Desco, *iScience* **23** (8), 101432 (2020).
316. A. A. Selifonov and V. V. Tuchin, *J. Biomed. Photonics Eng.* **6**, 040301 (2020).
317. D. K. Tuchina, I. G. Meerovich, O. A. Sindeeva, et al., *J. Biophotonics* **13** (11), e201960249 (2020).
318. P. A. Dyachenko, L. E. Dolotov, E. N. Lazareva, et al., *IEEE J. Sel. Top. Quant.* **27** (4) (2021).
319. L. M. Oliveira, K. I. Zaytsev, and V. V. Tuchin, *Biophotonics, SPIE Proc.*, **11585**, 1158503, (2020).
320. T. Yu, J. Zhu, D. Li, and D. Zhu, *iScience* **24** (3), 102178 (2021).
321. B. A. Mazin, B. Bumble, S. R. Meeker, et al., *Opt. Express* **20** (2), 1503 (2012).
322. B. A. Mazin, S. R. Meeker, M. J. Strader, et al., *Publ. Astronom. Soc. Pacific* **125** (933), 1348 (2013).
323. B. A. Mazin, J. Bailey, J. Bartlett, et al., *arXiv: 1908.02775 [astro-ph.IM]* (2019).
324. I. E. Zadeh, J. Chang, J. W. N. Los, et al., *Appl. Phys. Lett.* **118** (19), 190502 (2021).
325. E. E. Wollman, V. B. Verma, A. D. Beyer, et al., *Opt. Express* **25** (22), 26792 (2017).
326. H. Wang, J. Guo, J. Miao, et al., *Small*, 2103963 (2021).
327. Y. Zhang, Y. Wu, X. Wang, et al., *ACS Photonics* **5** (5), 2008 (2018).
328. R. H. Hadfield, *Nat. Photonics* **3** (12), 696 (2009).
329. K. K. Likharev, *Proc. IEEE* **87** (4), 606 (1999).
330. Е. В. Проскурнина, А. В. Алексеев, Т. В. Жидкова и др., в *Матер. научн. симп. «Проблемы медицинской биофизики»* (Москва, 2012), с. 36.
331. И. В. Образцов и М. А. Годков, *Молекуляр. медицина*, № 4, 3 (2013).
332. Г. К. Владимиров, Е. В. Сергунова, Д. Ю. Измайлов и Ю. А. Владимиров, *Вестн. РГМУ*, № 2, 65 (2016).
333. И. В. Образцов, М. А. Годков, В. В. Кулабухов и др., *Общая реаниматология* **13** (1), 40 (2017).
334. В. М. Земсков, А. М. Барсуков, А. А. Безносенко и др., *Изучение функционального состояния фагоцитов человека (кислородный метаболизм и подвижность клеток). Методические рекомендации МЗ РФ* (М., 1988).
335. R. N. Tilbury and T. I. Quickenden, *J. Biolumin. Chemilumin.* **7** (4), 245 (1992).
336. А. Г. Гурвич и Л. Д. Гурвич, *Митогенетическое излучение: Физико-химические основы и приложения в биологии и медицине* (Медгиз, М., 1945).
337. А. Г. Гурвич и Л. Д. Гурвич, *Митогенетический анализ биологии раковой клетки* (Изд. ВИЭМ, М., 1937).
338. Б. С. Песоченский, Дисс. ... д-ра мед. наук (Ленинградский онкологический институт, 1942).
339. А. Г. Гурвич, Л. Д. Гурвич, С. Я. Залкинд и Б. С. Песоченский, *Учение о раковом тушителе: Теория и клиника* (Изд-во АМН СССР, М., 1947).
340. В. П. Нагорянская, Дис. ... канд. мед. наук (Центральный онкологический институт НКЗ РСФСР, 1945).

341. О. Е. Нудольская, Дисс. ... д-ра мед. наук (2-я Акушерско-гинекологическая клиника 2-го Московского государственного медицинского института, 1945).
342. Е. Е. Авчина, Дисс. ... канд. мед. наук (Институт онкологии, 1950).

Methods for the Study of Ultraweak Photon Emission from Biological Objects.

III. Physical Methods

E.V. Naumova*, Yu.A. Vladimirov, V.V. Tuchin***, ****, *****^{****},
V.A. Namiot**, and I.V. Volodyaev****

**Rzhanov Institute of Semiconductor Physics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, prosp. Akademika Lavrentieva 13, Novosibirsk, 630090 Russia*

***Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1, Moscow, 119991 Russia*

**** National Research Saratov State University named after N.G. Chernyshevsky, ul. Astrakhanskaya 83, Saratov, 410012 Russia*

*****National Research Tomsk State University, prosp. Lenina 36, Tomsk, 634050 Russia*

******Institute of Precision Mechanics and Control, Federal Research Centre «Saratov Scientific Center» of the Russian Academy of Sciences, ul. Rabochaya 24, Saratov, 410028 Russia*

******Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Centre «Fundamentals of Biotechnology» of the Russian Academy of Sciences, Leninsky prosp. 33/2, Moscow, 119071 Russia*

This paper constitutes the last third part of the review on the methods for investigation of ultraweak photon emission from biological objects. The first part treated common questions (history of research, basic terms and others), the second part presented analysis of biological detection methods. The third part covers physical methods for investigation of ultraweak photon emission: basic devices and principles of photon detection are briefly described, various approaches to improve the signal/noise ratio are considered, a number of experimental schemes, specifics of different research methods and research findings obtained are presented, prospects of further development of instrumentation and future research directions are discussed.

Keywords: ultraweak photon emission from biological objects, chemiluminescence, ultraweak optical radiation detection, spectral analysis, biophotonics, photomultiplier tubes, CCD-cameras