

УСПЕХИ ФИЗИЧЕСКИХ НАУК**ПРИМЕНЕНИЯ СПЕКТРОСКОПИИ В БИОЛОГИИ И БИОХИМИИ *)**

Л. А. Тумерман

В задачу настоящего сообщения отнюдь не входит сколько-нибудь детальный обзор спектров различных биологически важных объектов. Не говоря уже о том, что количество исследованных в настоящее время объектов настолько велико, что дать обзор всего этого материала в рамках доклада невозможно, мне кажется, что и сам по себе такой обзор вряд ли представлял бы интерес для большинства участников нашего совещания.

Я ограничу поэтому свою задачу тем, что попытаюсь, с одной стороны, кратко охарактеризовать те особенности биологических объектов и целей их исследования, которые обуславливают необходимость развития специальных методик спектрального анализа и анализа спектров этих объектов, а с другой стороны, постараюсь на нескольких примерах показать огромные возможности спектроскопии в выявлении физических механизмов ряда фундаментальных биологических процессов.

1. Следует прежде всего подчеркнуть тот факт, что биологические объекты не только представляют собой системы необычайно сложные (неизмеримо более сложные, чем те, с какими мы встречаемся в технике и в неорганическом мире), но что именно в их сложности, в координированном протекании множества взаимосвязанных реакций, в непрерывном обмене веществом и энергией с внешней средой, в непрерывном процессе создания и распада сложнейших специализированных структур и заключается специфичность жизненных процессов, принципиальное отличие живого от неживого. Поэтому, сколь бы важным ни было изучение состава и структуры отдельных веществ, которые удастся выделить из организма в более или менее неизменном виде, с широкой биологической точки зрения такое изучение является лишь предварительным этапом. Конечной же целью всегда является физико-химическое изучение живой материи в интактном виде, в нормальных физиологических условиях ее функционирования.

С другой стороны, следует иметь в виду, что за исключением некоторых частных вопросов, например, связанных с наличием микроэлементов, целью физико-химического исследования биологических материалов является не установление глобального атомного состава молекул этих веществ, а изучение деталей их химического строения: структурной химической формулы, стереохимических соотношений, наличия тех или иных функциональных групп, распределения связей, наличия или отсутствия вторичных, особенно водородных, связей и т. п.

В силу этих причин обычные деструктивные методы спектроскопии — искровой, пламенной и дуговой эмиссионный спектральный анализ — находят себе лишь очень ограниченные применения в биологических и

*) Доклад на XII Всесоюзном совещании по спектроскопии.

биохимических исследованиях. Основную роль здесь играет абсорбционная спектроскопия, а из методов эмиссионной спектроскопии наибольшее значение имеет изучение фотолюминесценции и, частично, хемилюминесценции биологических веществ и живых объектов. В этих случаях воздействие возбуждающего свечения агента является достаточно «мягким», чтобы можно было считать его не изменяющим существенно свойства и строение объекта.

2. Спектральный анализ биологических материалов в принципе может, конечно, основываться на изучении спектров поглощения этих материалов в любой области спектра—ультрафиолетовой, видимой и инфракрасной,—и для каждой из этих областей можно указать примеры весьма успешного применения спектральных методов для идентификации тех или иных веществ. В ультрафиолетовой области, например, классическим примером достижений спектроскопии являются выполненные еще в 20-е годы работы Поля, позволившие проследить за весьма важным процессом образования витамина D из эргостерола под действием ультрафиолетовых лучей. В видимой области спектра изучение спектров поглощения дало особенно много ценных данных при изучении важнейших пигментов: гемоглобина и хлорофилла. Многочисленные применения спектрофотометрии в видимой области и описание соответствующих методик можно найти в ряде книг и обзоров, специально посвященных этому вопросу, и это избавляет меня от необходимости говорить об этом подробнее.

При всем том нужно, однако, указать, что в последние годы важнейшее значение для биологических и биохимических исследований приобрела самая молодая ветвь спектроскопии—инфракрасная спектроскопия, интенсивное развитие которой происходило в основном в годы после конца второй мировой войны. Это относится как к спектральному анализу (идентификации различных веществ по тем «отпечаткам пальцев», которые хранятся в их инфракрасных спектрах поглощения), так и в еще большей степени к анализу спектров, т. е. к методам установления эмпирической или теоретической связи между теми или иными особенностями спектров и строением соответствующих молекул.

Причины того, что именно инфракрасная спектроскопия становится во все возрастающей степени генеральной линией развития спектроскопических методов в биологии и биохимии, коренятся в некоторых специфических особенностях биологических веществ, на которых я хотел бы в первую очередь остановить Ваше внимание.

По своему функциональному значению и биологической активности эти вещества можно разделить на ряд основных групп. Такими являются, например, белки, к которым относятся многие гормоны и все ферменты, катализирующие и направляющие течение биохимических реакций, нуклеиновые кислоты, играющие решающую роль в процессах авторепродукции и биосинтеза и несущие в себе основной запас генетической информации, стероидные гормоны, определяющие течение важнейших жизненных процессов, жироподобные вещества—липиды и т. д. Все эти группы достаточно резко отличаются по своему химическому составу и строению, и это находит свое отражение в строении их электронных спектров и в спектрах их поглощения в ультрафиолетовой, а иногда и в видимой области. Так, например, белки имеют характерный максимум абсорбции около 2800 Å, тогда как максимум абсорбции для нуклеиновых кислот лежит около 2600 Å, и это обстоятельство часто используется для обнаружения белков или нуклеиновых кислот в тех или иных объектах.

Однако в каждую группу входит множество индивидуальных веществ, резко различающихся по своей биологической активности и значению и вместе с тем сравнительно мало отличающихся по своему составу и строе-

нию. Так, среди белков в настоящее время насчитывают до 100 000 отдельных веществ, несущих в организме самые разнообразные функции: коллаген, например, входящий в состав связок, костей и кожи, создает скелетную основу с ее механическими свойствами; функция гемоглобина, входящего в состав красных кровяных клеток, заключается в том, что он соединяется с кислородом в легких и освобождает его в тканях; мышечный белок миозин играет основную роль в процессе превращения потенциальной энергии химических связей определенных соединений в механическую работу, совершаемую мышцей; такие ферменты как пепсин, трипсин и многие другие катализируют и направляют процесс пищеварения, тогда как цитохром с и ряд других окислительно-восстановительных ферментов регулируют окисление пищи в клетках и т. д. Список этот можно было бы продолжить почти до бесконечности. Чем же отличаются друг от друга в химическом отношении все эти столь различные по своей биологической функции белки?

В первом очень схематичном приближении белок можно представлять себе как длинную полипептидную цепь, содержащую в боковых ответвлениях разнообразные аминокислотные остатки, несущие различные химические функции. Основной ячейкой этой цепи, повторяющейся во всех ее звеньях, является амидная группа CCONH_2 , отмеченная на рис. 1 жирными штрихами. С точностью до нескольких сотых долей ангстрема эта группа является компланарной, т. е. все ее атомы лежат в одной плоскости. Атомы углерода C' принадлежат каждой отдельной группе, тогда как атомы C принадлежат обоим смежным группам и устанавливают связь между ними. Этот угловой, шарнирный атом углерода связан с соответствующими атомами смежных амидных групп простыми химическими связями, так что, вообще говоря, эти группы могли бы быть повернуты друг относительно друга вокруг этой связи на различные углы. Однако энергетически наиболее выгодным и потому фактически реализуемым является такое расположение этих групп, при котором создается возможность образования водородной связи между атомом азота в одной группе и атомом кислорода в другой, что соответствует расстоянию между ними в 2,79 Å. Следствием этого является то, что в большинстве случаев молекулы белков имеют спиральную конфигурацию, изображенную на рис. 2. С угловыми атомами углерода, осуществляющими связь между амидными группами, связаны боковые группы аминокислотных остатков, простирающиеся в третьем измерении, т. е. выходящие из плоскости амидных групп.

В отличие от многих других органических полимеров, например от клетчатки или каучука, в молекулах которых повторяются одни и те же атомные группировки, в белках могут чередоваться в весьма разнообразных последовательностях различные аминокислотные остатки. Один из наиболее поразительных фактов, установленных биохимиками, заключается в том, что из огромного числа существующих аминокислот в состав белков всех известных нам организмов входит одна и та же группа из 20 аминокислот. Несколько дополнительных аминокислот было обнаружено только в белках некоторых простейших организмов. По-видимому, на протяжении эволюции происходил своеобразный процесс стандартизации и отбора того минимального набора аминокислот, который

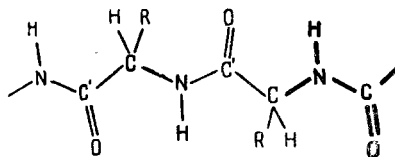


Рис. 1. Схема строения полипептидной цепи. Жирными штрихами в правой части рисунка отмечена амидная группа CCONH_2 . Буквой R обозначены атомы или атомные группировки в боковых цепях.

необходим и достаточен для построения всех функционально-необходимых белков.

Установить простую связь между аминокислотным составом того или иного белка и его биологической функцией нельзя. С одной стороны, известны случаи, когда тождественные по своей биологической активности белки, например гормон инсулин, полученные от разных животных (быка, овцы и свиньи), заметно отличаются по своему аминокислотному составу. С другой стороны, часто очень небольшие, казалось бы, изменения аминокислотного состава приводят к радикальным, иногда катастрофическим изменениям функции белков. По-видимому, химические функции каждого остатка в составе белковой молекулы отличны от его функций в чистом

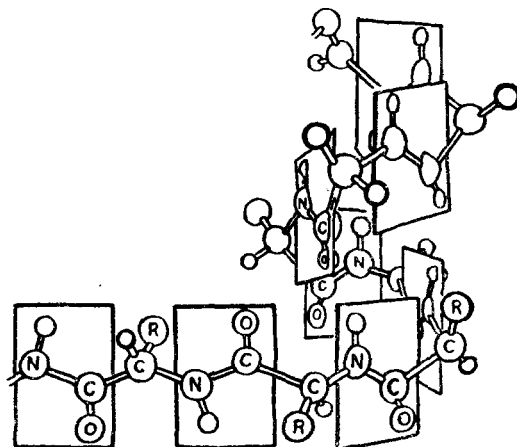


Рис. 2. Структурная форма полипептидной цепи, так называемая α -спираль. Прямоугольниками отмечены отдельные плоские амидные группы. R —простирающиеся в третьем измерении, вне плоскости амидных групп, боковые цепи. Для ясности в первых двух амидных группах в нижней левой части рисунка не учтен угол поворота одной из них относительно другой в третьем измерении.

виде и в большой мере определяются его окружением, т. е. свойствами молекулы как целого. Решающее значение имеет не столько сам по себе аминокислотный состав белка, сколько последовательность расположения отдельных остатков по всей цепи или в отдельных ее биологически наиболее важных участках.

Очень впечатляющим примером такого глубокого влияния небольших химических изменений является раскрытие загадки так называемой «серповидно-клеточной» болезни, ежегодно уносящей огромное количество жертв среди населения Центральной и Южной Африки. Название этой болезни связано с тем, что при ней наблюдается своеобразное изменение формы эритроцитов—красных кровяных телец,—которые вместо обычной эллипсоидальной формы принимают форму серпа.

Подобно ряду других заболеваний (таких, например, как гемофилия или средиземноморская анемия) серповидно-клеточная болезнь является наследственной, т. е. генетически обусловленной определенными изменениями в хромосомах. Восьмая часть рождающихся детей обречена на смерть в раннем возрасте из-за серповидно-клеточной болезни.

Недавно Ингрэм¹ произвел исследование аминокислотного состава белков эритроцитов здоровых людей и людей, больных серповидной болезнью. Оказалось, что из примерно 300 аминокислот только одна оказалась у больных иной, чем у здоровых. Этого небольшого изменения достаточно, чтобы обусловить указанные выше катастрофические последствия.

Другой, очень яркий пример необычайной биологической чувствительности к небольшим химическим изменениям дают нам так называемые стероидные гормоны, выделяемые различными железами внутренней секреции и являющиеся одним из важнейших факторов, регулирующих протекание основных физиологических и психических процессов.

Общая химическая структура этих важнейших соединений характеризуется наличием четырех конденсированных колец (рис. 3). С этой основной струк-

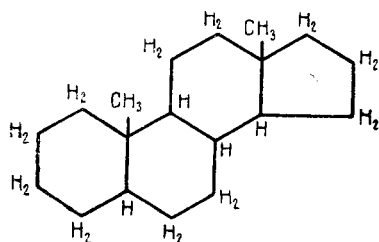


Рис. 3. Общая структурная формула стероидных гормонов.

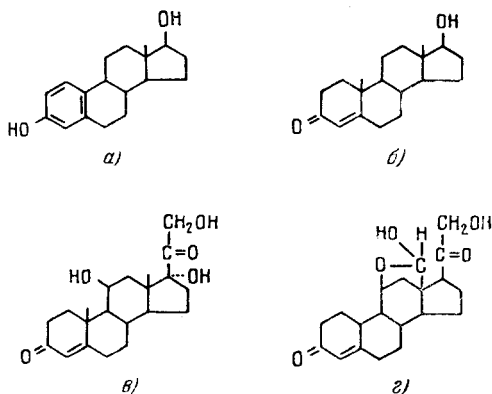


Рис. 4. Структурные формулы некоторых стероидных гормонов: а—эстрадиол, б—тестостерон, в—гидрокортизон, г—альдостерон.

турой связаны другие функциональные группы, и сравнительно небольшие изменения в этих группах оказываются достаточными, чтобы коренным образом изменить функцию гормона. На рис. 4 изображены структуры четырех стероидных гормонов. Гормон эстрадиол (рис. 4а) вырабатывается яичниками женщины и несет основную ответственность за физические и психические аспекты женского пола, тогда как гормон тестостерон (рис. 4б) играет такую же роль по отношению к мужскому

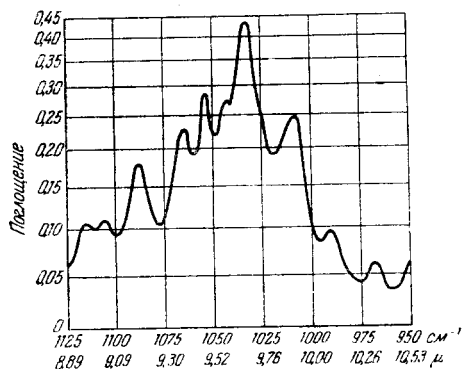


Рис. 5. Спектр поглощения чистого этиохоланолона в области 8,89—10,53 μ .

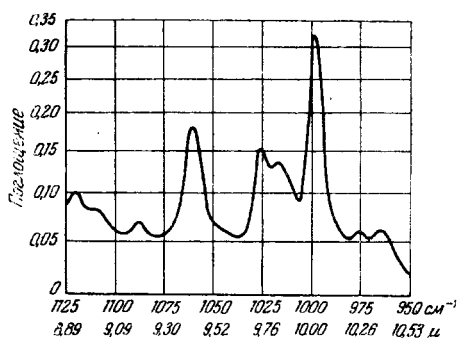


Рис. 6. Спектр поглощения чистого андростена в области 8,89—10,53 μ .

полу. Из рисунка видно, что это колоссальное функциональное различие между двумя указанными гормонами связано с очень небольшой перегруппировкой связей в них.

Совершенно понятно, что этих небольших изменений в большинстве случаев недостаточно, чтобы создать такие изменения электронного спектра молекул, которые могли бы быть обнаружены в спектре ее поглощения. Напротив, в инфракрасном спектре, отражающем частоты колебаний и вращений отдельных групп атомов в молекуле, эти изменения часто

проявляются с полной отчетливостью. В качестве иллюстрации на рис. 5 и 6 приведены инфракрасные спектры поглощения двух стероидных гормонов—андростерона и этиохоланолона, гормона, тесно связанного с развитием рака и, кстати сказать, обнаруженного и идентифицированного именно по его инфракрасному спектру поглощения. Хотя спектры эти сняты в сравнительно узком спектральном интервале от 8,89 до 10,53 μ , тем не менее из рисунков легко видеть, как богаты они деталями и как

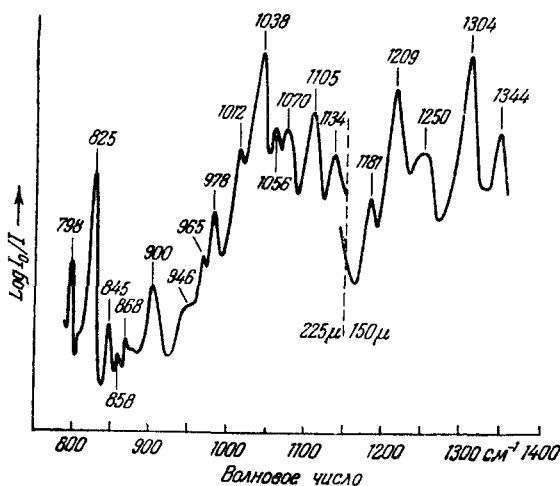


Рис. 7. Спектр поглощения аденозина в области 800—1400 см^{-1} — $8=12,5-7 \mu$.

характерны для изучаемых веществ, несмотря на их химическую близость.

Такую же богатую деталями картину дают и инфракрасные спектры поглощения многих других биологических веществ. В качестве примера на рис. 7 приведен спектр аденозина в области от 800 до 1400 см^{-1} , полученный Моралесом и Чеккини². Аналогичную картину дает и актомиозин—основной белковый компонент мышцы, играющий главную роль в процессе ее сокращения. По данным Леконта и его сотрудников³ в спектре мышцы ля-

гушки удается даже обнаружить определенные изменения в зависимости от того, подвергалась или не подвергалась предварительно мышца изометрическому сокращению.

Не только спектры отдельных веществ, извлеченных из биологического субстрата, но иногда и спектры самого этого субстрата часто также обнаруживают весьма характерную структуру и поддаются расшифровке. На рис. 8 в качестве примера показан спектр среза надпочечников человека (кривая I) и различных экстрактов из них в области от 2000 до 650 см^{-1} . Внизу указаны различные группировки, наличие которых в этой ткани можно установить из сопоставления этих спектров. Перед нами, несомненно, пример весьма успешного спектрального анализа такого сложного объекта по многим компонентам. В ряде случаев удавалось даже идентифицировать по инфракрасным спектрам поглощения не только роды и виды бактерий, но и отдельные разновидности внутри вида.

Если теперь, для сравнения, мы перейдем к ультрафиолетовым спектрам абсорбции биологических веществ, то увидим картину, несравненно более бедную. Наиболее сильными и четко выраженными полосами абсорбции в ультрафиолете обладают ароматические аминокислоты: триптофан, тирозин и фенилаланин, а также нуклеиновые кислоты. Спектры этих веществ по Тореллу⁵ показаны на рис. 9. Легко видеть, в какой мере эти спектры лишены структурных деталей, которые позволили бы расшифровать их структуру или идентифицировать их в составе веществ, в которые они входят. Понятно, что в биологическом субстрате, где сосуществует множество веществ, сигналы, подаваемые отдельными компонентами или отдельными атомными группами в сложных молекулах, тонут в общем «шуме», и получаемые картины редко дают возможность сделать какие-нибудь выводы, кроме самых общих.

На рис. 10, например, показаны ультрафиолетовые спектры абсорбции некоторых биологических веществ, взятые из работы Сандриттера. Что можно сказать по этим кривым? Максимум на кривых 1 и 2 вблизи

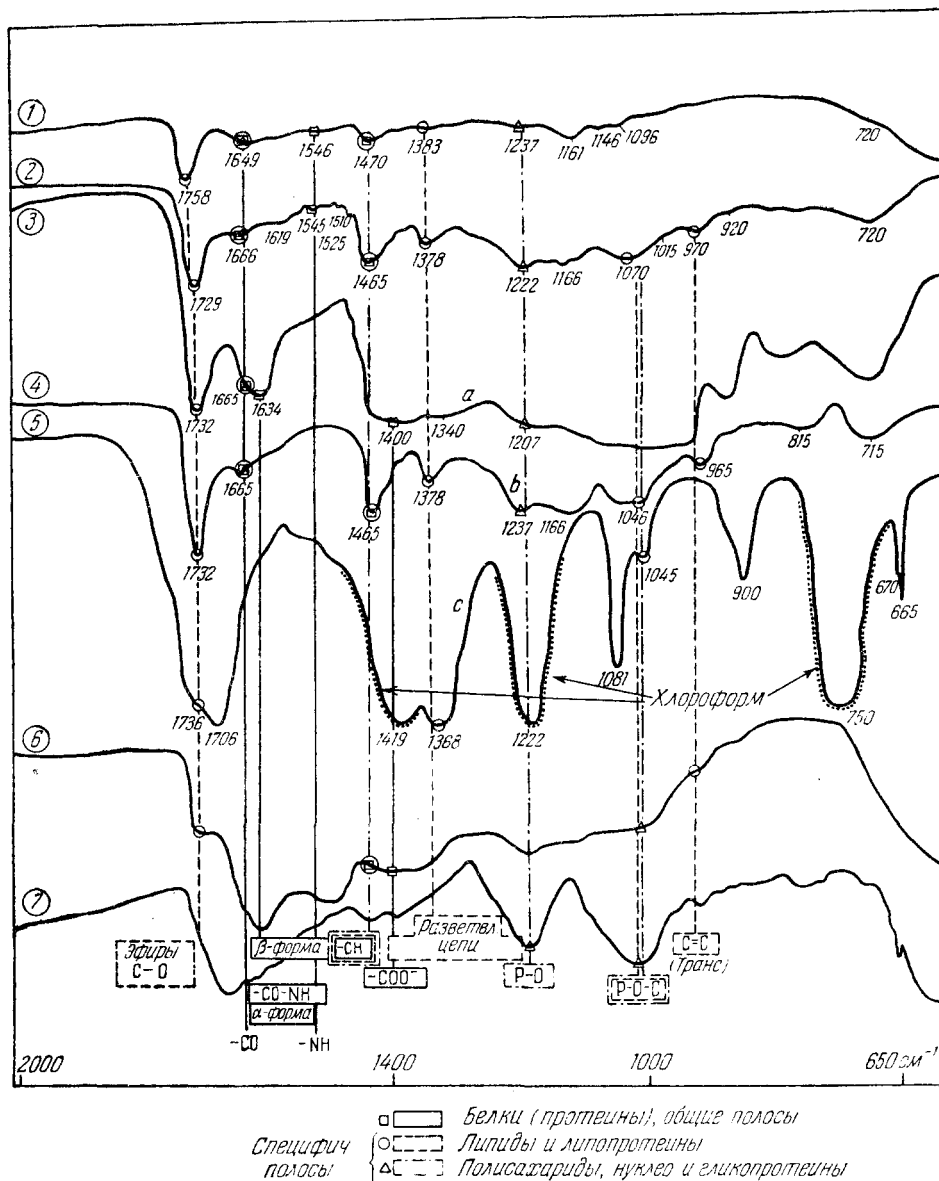


Рис. 8. Инфракрасные спектры поглощения ткани надпочечников и различных экстрактов из нее: 1—высушенная в замороженном виде ткань, 2—общий липоидный экстракт, 3—фракция цитоплазмы, полученная ультрацентрифугированием в тростниковом сахаре, 4—то же, общий липоидный экстракт, 5—то же, фракция глицериды холестерина, 6—общая кашица, 7—нуклеиновая кислота. По Вегманну ⁴.

2800 Å указывает на то, что в составе соответствующих объектов главным компонентом являются белки, а максимум около 2600 Å на кривой 3 указывает на наличие большого количества нуклеиновых кислот; плечо на этой кривой вблизи 2800 Å говорит о наличии тирозина и триптофана,

а вторичный максимум на кривой 1 около 3300 Å свидетельствует о наличии тиреоглобулина, белка, содержащего тирозин. О ядрышке (кривая 4) можно сказать, что в нем, по-видимому, имеются и белковая компонента и нуклеиновые кислоты. Информация, как видим, весьма общая и явно недостаточная.

Выражаясь на привычном сейчас радиотехническом языке, мы можем сказать, что для биологических объектов «отношение сигнала к шуму» в инфракрасной области значительно более благоприятно, чем в ультрафиолетовой, и в этом заключена основная причина, определяющая доминирующее значение инфракрасной спектроскопии в биологических и биохимических исследованиях.

3. Богатство заключенной в инфракрасном спектре информации, наличие в нем весьма характерных «отпечатков пальцев» большого числа биологически важных соединений имеет огромное значение прежде всего для спектрального анализа этих соединений, т. е. для их обнаружения и идентификации. Оно не менее важно, однако, и для анализа спектров, т. е. для расшифровки по спектрам сложной структуры этих соединений.

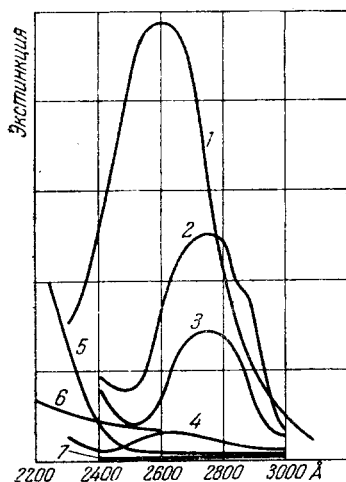


Рис. 9. Спектры поглощения некоторых биологически важных веществ в ультрафиолете: 1—нуклеиновая кислота, 2—триптофан, 3—тирозин, 4—фенилаланин (отношение 0,4 : 1 : 1 : 1), 5—другие аминокислоты, 6—рэлеевское рассеяние, 7—потери на отражение и преломление.

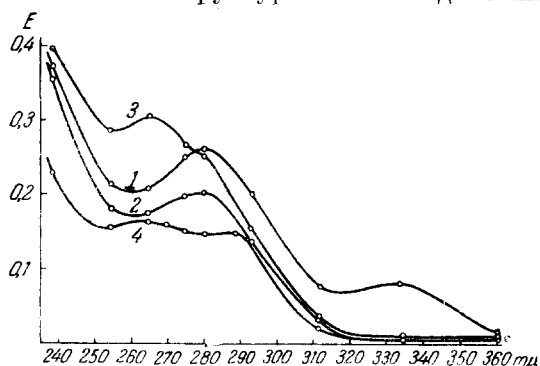


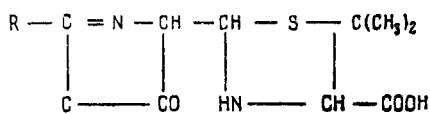
Рис. 10. Спектры поглощения в ультрафиолете: 1—коллоид из щитовидной железы, 2—цитоплазма парафолликулярных клеток, 3—цитоплазма фолликулярной клетки, 4—ядрышко.

Впервые возможности применения инфракрасной спектроскопии для решения этих труднейших задач были показаны при установлении структуры пенициллина, выделение которого открыло в медицине новую эру—эру антибиотиков. Задача эта была настолько важна, что в военные годы в Англии и США была организована очень широкая совместная работа обширных групп исследователей. Дело было поставлено примерно так же, как при разработке атомных проектов. Классические методы химии привели к заключению, что пенициллин может иметь одну из трех структур, изображенных на рис. 11, но не давали возможности сделать окончательный выбор между этими структурами. Считалось, что структура (1) является наиболее вероятной, а структура (2) наименее вероятной. Инфракрасные спектры однозначно указывали на структуру (3), причем решающее значение имело аномальное положение полосы поглощения одной

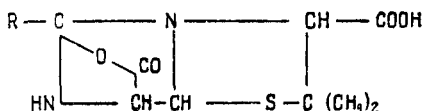
из карбонильных групп вблизи 5,62 μ . Такое же положение этой полосы было затем обнаружено в специально синтезированных модельных соединениях с β -лактамой структурой, и, наконец, рентгеноструктурный анализ окончательно подтвердил предсказания инфракрасной спектроскопии.

Это выдающееся достижение, наряду с успехами, достигнутыми во многих отраслях химической технологии, в частности при анализе и расшифровке структуры нефтей и нефтепродуктов, привлекло внимание большого числа исследователей и послужило переломным пунктом в развитии инфракрасной спектроскопии. Решающую роль в этом развитии сыграло, конечно, происходившее в эти годы интенсивное развитие оптического приборостроения и создание, в частности, ряда конструкций высокоавтоматизированных спектрофотометров для всех областей спектра, сделавшее задачу получения и изучения спектров доступной очень широкому кругу работников промышленных, химических и медицинских учреждений, не обладающих специальной физической квалификацией. Еще в первые годы нашего века промышленного выпуска приборов для изучения инфракрасных спектров не было, и работа в этой части спектра была доступна лишь очень ограниченному числу физических лабораторий и исследователей, которые были в состоянии сами готовить для себя соответствующую аппаратуру. Сейчас как-то даже странно читать о том, что когда в 1909 г. Тваймэн пытался наладить в фирме Хильгер промышленный выпуск инфракрасных спектральных приборов, то ряд специалистов отговаривал его от этого, указывая на отсутствие спроса на такие приборы. В годы между двумя мировыми войнами выпуск кое-каких инфракрасных спектральных приборов был у ряда фирм налажен, но эти приборы по-прежнему требовали высокой специализации работников и походили на современные автоматизированные приборы примерно так же, как полотняные «Блерно» времен первой войны на современный самолет.

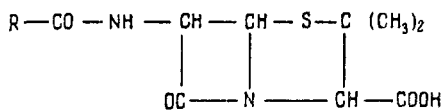
После второй мировой войны все ведущие фирмы оптического приборостроения с необычайной интенсивностью занялись разработкой и выпуском новых и все более совершенных моделей спектральных, в частности инфракрасных, приборов. Это усовершенствование техники съемки спектров необычайно расширяло область применения спектроскопии, а в свою очередь расширение спроса все время стимулировало работу в области приборостроения. К настоящему времени этот этап уже можно считать в основном завершенным. Во всех технически развитых странах мира — в том числе и у нас в СССР — выпущено большое количество высокоавтоматизированных спектральных приборов, делающих работу в инфракрасной области спектра доступной для любой промышленной или исследовательской лаборатории. Существенные успехи были достигнуты и в разработке методики подготовки образцов для исследования инфракрасных спектров



1 Оксалоновая структура



2 Трициклическая структура



3 β -лактамая структура

Рис. 11. Три структуры пенициллина, считавшиеся возможными по данным химических исследований.

поглощения. Особый интерес здесь представляет методика включения исследуемого вещества во вмещающую среду из порошкообразного бромистого калия или других прозрачных в инфракрасной области кристаллов. По существу эту методику предложил еще в 1928 г. Маслаковец⁷, который получал смешанные кристаллы щелочно-галогидных солей (преимущественно KCl), в которые было включено в небольших концентрациях исследуемое вещество. В последние годы эта методика была развита и усовершенствована за рубежом рядом исследователей⁸⁻¹³, которые широко внедрили в практику инфракрасной спектроскопии метод запрессовки исследуемого вещества в таблетки из порошкообразного KBr и других материалов, прозрачных в инфракрасной области.

Это не означает, конечно, что можно ослабить внимание к разработке новых моделей спектральных приборов и к усовершенствованию методики подготовки образцов. Наоборот, успешное развитие науки, в первую очередь органической химии, биологии и биохимии, настоятельно требует максимальной интенсификации этой работы и выпуска новых, более совершенных моделей приборов в достаточном количестве. Существенно, однако, то, что принципиальные трудности, по крайней мере в том спектральном диапазоне, который используется сейчас, т. е. примерно до 40 μ , уже преодолены и что сейчас уже не техника получения спектров абсорбции является узким местом, лимитирующим развитие науки.

На первый план сейчас выдвигаются новые трудности. С одной стороны, они связаны с тем, что необычайно широкое развитие работ в области спектроскопии вообще и инфракрасной, в частности, привело к накоплению почти необозримого количества данных о спектрах самых разнообразных веществ. Достаточно для иллюстрации указать, что последний большой обзор по инфракрасной спектроскопии, написанный Леконтом и помещенный в 26-м томе большой Международной физической энциклопедии («Handbuch der Physik»), содержит почти 700 страниц большого формата и очень убористой печати. Одна только библиография работ по применению инфракрасной спектроскопии в биологии и биохимии, составленная Кларком и Чанто¹⁴ занимает около 50 страниц. Возникает серьезная проблема такой систематизации и организации хранения этой информации, которая обеспечила бы возможность эффективно пользоваться ею.

С другой стороны, сложность инфракрасных спектров и обилие содержащейся в них информации, открывая очень большие возможности для идентификации биологических соединений и качественного спектрального анализа, создают в то же время очень значительные трудности для количественного определения отдельных компонент смеси, обнаруживаемых по этим спектрам. При ручной технике обработки спектров такой количественный анализ в очень большом числе случаев оказывается практически неосуществимым, между тем как именно изменения количества отдельных компонент, притом часто компонент, содержащихся в чрезвычайно малых количествах, представляют большой биологический интерес, в частности при диагностике ряда заболеваний, например рака, или при изучении таких необратимых процессов, как старение. Поэтому задача создания специальных электронно-счетных машин для обработки спектров и количественного спектрального анализа приобретает сейчас первостепенное значение.

Насколько мне известно, первая успешная попытка разработки такой специальной электронно-счетной машины и ее применения для конкретных диагностических целей была осуществлена Роговым в Федеральной лаборатории связи в США¹⁵. Я остановлюсь на этой работе несколько подробнее, так как задача автоматизации методов количественного спектрального анализа имеет важное значение не только для биологических и биохимических исследований, но и вообще для всего спектрального анализа.

Рис. 12 поясняет принципиальную идею, положенную Роговым в основу построенной им машины. Положим, что качественный анализ дал основания предполагать наличие в данном веществе некоторого количества компонент, спектры которых f_1, f_2, f_3, \dots известны и вводятся в машину в качестве исходных данных. В примере на рис. 12 таких компонент имеется четыре. Предполагая линейность наложения спектров, т. е. отсут-

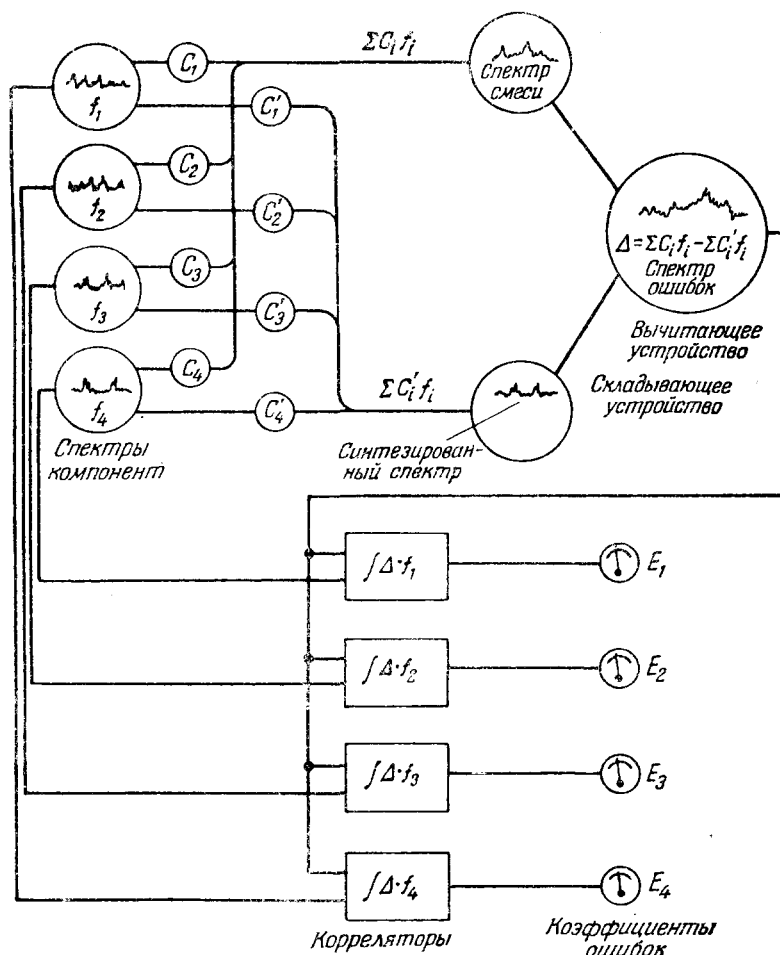


Рис. 12. Принципиальная схема электронно-счетной машины Рогова для количественного спектрального анализа.

ствие взаимодействий между компонентами, мы должны, очевидно, так подобрать значения соответствующего числа коэффициентов c_i , чтобы «синтезированный спектр» $\Sigma c_i f_i$ практически не отличался от спектра исследуемого вещества. Эти значения коэффициентов и представляют собой относительные количества компонентов в смеси.

Автоматизацию решения этой задачи Рогов осуществляет следующим образом. Задав коэффициентам c_i произвольные значения c'_i , мы на машине вычисляем «синтезированный спектр» $\Sigma c'_i f_i$ и вычитаем его из спектра данного вещества. Полученный разностный спектр $\Delta = \Sigma c_i f_i - \Sigma c'_i f_i$ Рогов называет «спектром ошибок». Очевидно, что наилучшим математическим решением задачи будет то, которое дает минимальное среднее квадратичное расхождение между «синтезированным» спектром и спектром

изучаемого вещества. Иными словами, мы должны варьировать значения коэффициентов c'_i до тех пор, пока не обратятся в нуль все коэффициенты корреляции между каждым из спектров компонент и «спектром ошибок», т. е. пока не обратятся в нуль все интегралы $E_i = \int \Delta f_i d\lambda$.

Значения этих интегралов машина вырабатывает сама; при этом, если некоторый коэффициент корреляции E_i оказывается положительным, то это означает, что принятое значение соответствующего коэффициента c'_i было завышено и должно быть уменьшено; напротив, если некоторое $E_i < 0$, то соответствующий коэффициент c'_i должен быть увеличен. Это позволяет связать узлы машины E_i и c'_i сервомеханизмом, который варьирует значения коэффициентов c'_i до тех пор, пока все интегралы E_i не обратятся в нуль.

Машина дает, таким образом, математически наилучшее приближение к спектру исследуемого вещества, какое можно получить исходя из принятых исходных спектров отдельных компонент. Но правильно ли полученное таким образом «наилучшее» приближение? Это зависит от того, правильно ли был произведен выбор предполагаемых компонент, т. е. от правильности качественного анализа. Заметим, что введение лишних компонент, фактически отсутствующих в данном веществе, не существенно, так как машина сама даст для них нулевые содержания. Это позволяет быть достаточно щедрым и вводить в анализ все предполагаемые или «подозрительные» компоненты. Но мало того. Машина сама дает контроль правильности качественного анализа и в некоторых случаях указывает пути его исправления. Действительно, если после получения наилучших значений коэффициентов c'_i «спектр ошибок» обращается в нуль для всех частот, то это свидетельствует о правильности полученного решения, т. е. о том, что не была пропущена ни одна из существенных компонент. Если же остаточный спектр ошибок существенно отличается от нуля, то это указывает на ошибку в выборе исходных спектров. Иногда наличие в остаточном спектре ошибок тех или иных характерных полос абсорбции даже подсказывает пути улучшения этого выбора.

Первые модели машины Рогова были моделирующими, как это и показано на рис. 12. Однако дальнейшая работа показала, что более удобными являются машины цифровые. Спектры вводятся в эти машины не в виде привычных нам графиков, а в виде записанных по двоичной системе численных значений интегрального поглощения для разных частот. Все вычисления производятся по этой системе, причем полный анализ производится в течение нескольких минут.

Не говоря уже о колоссальной экономии времени и средств, которая позволяет применять методы количественного спектрального анализа, во многих случаях, где ранее применение этих методов было практически невозможно, автоматизация этих методов имеет два важных принципиальных преимущества. Во-первых, анализ производится по всей абсорбционной spectroграмме, а не по отдельным избранным длинам волн. Сглаживающее действие интегрального анализа значительно уменьшает ошибки, могущие иметь место при анализе по отдельным точкам, и делает результаты более точными и достоверными; в частности, оно ослабляет искажения, связанные с остаточным шумом измерительных приборов. Во-вторых, если есть основания предполагать, что в том или ином участке спектра анализ затруднен взаимодействием компонент и отступлениями от линейности при сложении их спектров, то эти участки можно просто пропустить при анализе. Инфракрасные спектры настолько богаты деталями, что остающейся информации в большинстве случаев вполне достаточно для точного анализа.

Возможности нового метода были убедительно продемонстрированы в работе Рогова и Галлахера¹⁶. В этом исследовании была поставлена задача точного количественного определения содержания в моче некоторых стероидных гормонов. Эта задача имеет чрезвычайно важное практическое значение, так как течение многих заболеваний, в частности рака, связано с резкими нарушениями гормональной деятельности организма и проявляется в больших изменениях количества вырабатываемых организмом гормонов. При раке уже на ранних предоперационных стадиях наблюдается повышение содержания гормонов в моче в несколько раз по сравнению с нормой; после удаления локализованной опухоли оно падает до нормы, а при возобновлении образования и распространении неоплазмы—в так называемой «метастатической фазе»—оно может превышать норму в сотни раз. Вместе с тем количества этих веществ настолько малы, что выделение их в чистом виде для количественного анализа требует очень сложной и трудоемкой работы, делающей этот анализ почти неприменимым в клинических условиях.

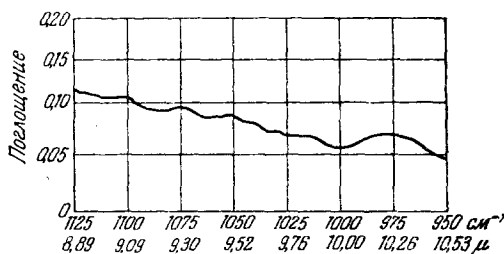


Рис. 13. Разностный спектр фона.

В работе Рогова и Галлахера исследовалось относительное содержание в определенной фракции мочи двух стероидных гормонов—андростерона и этнохоланолон, спектры которых были приведены на рис. 5 и 6. Все остальные компоненты мочи рассматривались как одна общая компонента, характеризовавшаяся во всех анализах одним и тем же общим спектром фона (рис. 13). Этот спектр был получен на одном образце как разность между спектром этого образца и спектром смеси двух указанных чистых гормонов, относительные количества которых подбирались так, чтобы в разностной спектрограмме уже не было заметно никаких следов стероидных материалов. Этот прием объединения большого числа не интересующих нас компонент в общий фон и выявления на этом фоне тех веществ, которые представляют интерес, весьма оригинален и имеет, как мне кажется, очень большую методическую ценность. Возможно, что в данном случае постоянство этого фона во всех исследованных образцах объяснялось общим химическим методом отбора той фракции мочи, которая подвергалась спектральному анализу. В дальнейшем, очевидно, развитие этого метода связано с накоплением «библиотеки» спектров различных соединений и созданием быстросействующих машин, способных производить анализ с различными «фонами».

Результат одного из анализов Рогова и Галлахера показан на рис. 14. Указанное на рисунке значение среднего квадратичного отклонения «синтезированного спектра» от исходного, равное в данном случае 5,4%, было вычислено самой машиной. Мне кажется, однако, что и одного взгляда на эти кривые достаточно, чтобы убедить всякого спектроскописта и аналитика в огромных возможностях машинной техники спектрального анализа.

На рис. 15 и 16 показан внешний вид машины Рогова и общий вид лаборатории инфракрасной спектроскопии в Институте рака в Нью-Йорке, где была установлена эта машина и проведено описанное выше исследование. Представляется несомненным, что успешное развитие методов спектрального анализа в СССР и широкое внедрение их в практику работы исследовательских, медицинских и промышленных лабораторий настоятельно требует скорейшей разработки и промышленного выпуска

подобных машин и у нас. В связи с этим, очевидно, возникает и необходимость в разработке и выпуске специальных устройств к инфракрасным спектрофотометрам, которые выдавали бы результаты не в виде обычных графиков, а в виде числовых записей по двоичной системе. Как указывает Рогов, такого рода полная запись спектра от 650 до 5000 см^{-1} может быть размещена на отрезке обычного фильма длиной в $2,5\text{ см}$ и может быть прочтена машиной за десятую долю секунды. При такой системе записи и хранения информации можно иметь в машине для сравнения и вычислений много тысяч спектров.

4. В биологических исследованиях часто возникает необходимость исследовать поглощение в образцах весьма малых размеров, например,

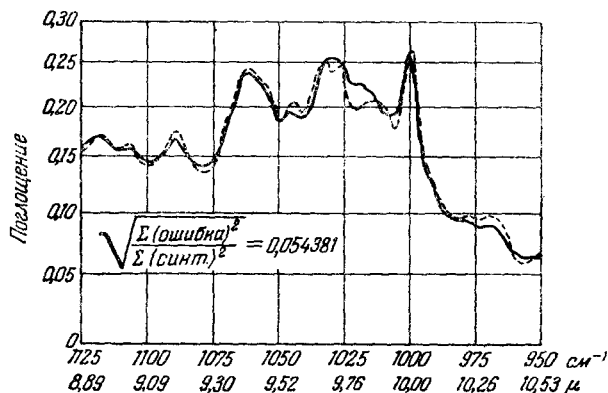


Рис. 14. Сплошная кривая—спектр поглощения исследованного образца мочи; пунктирная—вычисленный на машине синтезированный спектр при значениях коэффициентов: $C_1=0,599719$ (андростерон); $C_2=0,412143$ (этиохоланолон); $C_3=0,555639$ (фон).

в отдельных клетках или их частях, в малых участках срезов неоднородных тканей и т. п. Такая же необходимость часто возникает и в исследованиях биохимических. Многие биологически важные вещества чрезвычайно активны в ничтожно малых концентрациях, и часто количества их, имеющиеся в распоряжении исследователя, измеряются несколькими гаммами. Между тем при применении обычных спектрофотометров без дополнительных специальных приспособлений размеры образца не могут быть меньше размеров входной или выходной щели спектрального прибора, т. е. должны быть не меньше, чем $1 \times 10\text{ мм}$. Даже при толщине в 25 м объем такого образца не может быть меньше, чем приблизительно $2,5 \cdot 10^{-4}\text{ см}^3$, что для вещества с плотностью 1 соответствует массе в $1/4\text{ мг}$. Практически в большинстве случаев минимальная масса вещества, требуемая для работы с обычными спектрофотометрами, равна $1\text{—}2\text{ мг}$, и хотя применение специальных микрокувет позволяет несколько понизить этот предел, однако, все же этого совершенно недостаточно для многих биологических и биохимических работ. Здесь возникла поэтому необходимость в создании специальных так называемых микроспектрофотометрических методов исследования, основанных на сочетании микроскопов со спектрофотометрами.

В принципе все эти методы основаны на применении специальных микроиллюминаторов, отображающих источник в уменьшенном виде на образце, и объективов, восстанавливающих первоначальный ход лучей и отображающих образец в увеличенном виде на щели прибора или на детекторе излучения. Такую систему можно помещать либо перед входной щелью спектрального прибора, либо между его выходной щелью и детекто-

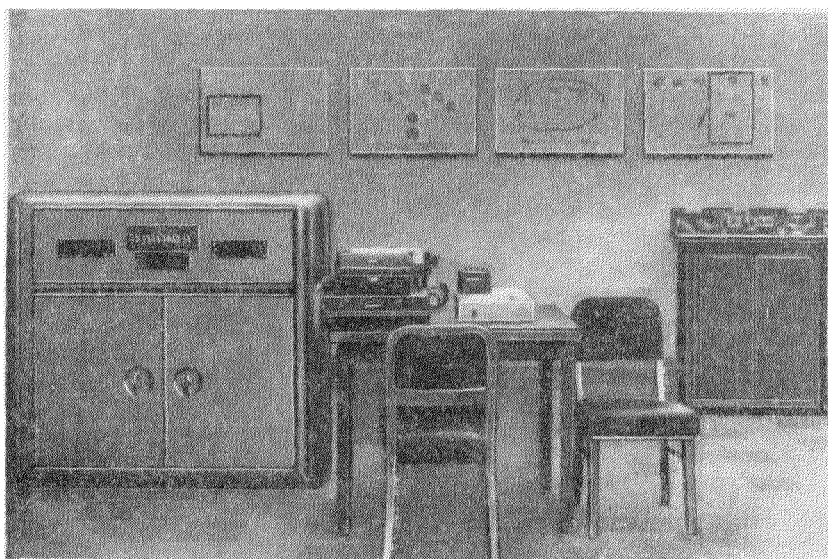


Рис. 15. Внешний вид счетно-аналитической машины Рогова.

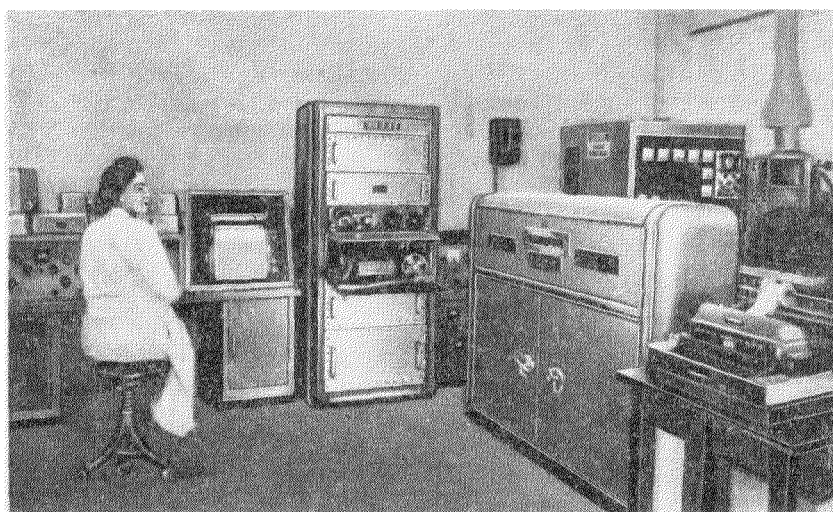


Рис. 16. Общий вид лаборатории инфракрасной спектроскопии в Институте рака в Нью-Йорке. Справа машина Рогова.

ром. Практически второе расположение выгоднее, так как концентрация неразложенного в спектр излучения источника света на образце может приводить к нежелательному его нагреванию. Впрочем, Коль и Джонс¹⁷ показали, что если образец зажать между двумя пластинками из NaCl, то температура образца не превышает 30°.

Простейшая система такого рода, сконструированная Андерсоном и Вудоллом¹⁸ и выпускаемая в качестве стандартного приспособления к спектрофотометру фирмы Бэрд, состоит из двух линз из хлористого серебра. Источник отображается первой линзой на образец с уменьшением (линейным) в три раза; вторая линза отображает образец с таким же увеличением на щель спектрального прибора. Исследуемая площадь образца при этом может быть уменьшена примерно в десять раз, т. е. до размеров $0,33 \times 3,3$ мм. Существенным недостатком этой системы является наличие больших аберраций, прежде всего хроматических. Это особенно существенно для инфракрасной спектроскопии, где приходится вести исследование в очень широком спектральном интервале от 2,5 до 15 μ , а выбор материалов для построения ахроматических систем очень ограничен. Требуемая в этих системах большая апертура обуславливает возникновение в них и других, не хроматических аберраций.

Поэтому решающее значение для развития микроспектрофотометрии имел переход к отражательной микроскопической оптике. В иностранной литературе обычно прогресс в этой области связывают с работой Барча¹⁹, опубликованной в 1947 г. Нужно, однако, отметить, что еще за несколько лет до этого отражательные микроскопические объективы были сконструированы и построены у нас в связи с широко известными работами Е. М. Брумберга по ультрафиолетовой микроскопии. Барч добился улучшения качества отражательных объективов путем применения асферических зеркал, но, по-видимому, практически это для целей микроспектроскопии не очень существенно, и вполне удовлетворительные системы могут быть построены и со сферическими зеркалами. Первая микроспектроскопическая установка с отражательной оптикой Кассегреновского типа была построена в 1949 г. Барром, Колем и Томпсоном²⁰. В современных конструкциях чаще применяются системы типа Шварцшильда. На рис. 17 слева показан ход лучей в такой системе, а справа внешний вид приспособления для микроспектрофотометрирования, выпускаемого в качестве дополнительного устройства к инфракрасному спектрофотометру фирмы Перкин—Эльмер. Прибор устанавливается после спектрофотометра, выходная щель которого *S* отображается в уменьшенном виде конденсором *C* на объекте *P*. Создаваемое объективом *O* увеличенное изображение располагается в плоскости диафрагмы *B*, исключая побочный свет; в случае надобности в этой плоскости могут помещаться шаблоны, соответствующие конфигурации образца. После прохождения через диафрагму лучи отклоняются плоским зеркалом и собираются отражательным конденсором на приемнике *T* (термоэлементе). Для контроля положения образца установка имеет вспомогательную оптику и вспомогательное освещение (на выходной щели монохроматора); при повороте плоского зеркала лучи направляются в контрольный окуляр *K*, где изображение образца рассматривается при увеличении в 175 раз.

Минимальные размеры образца, который может быть исследован при применении этих систем, лимитируются двумя факторами. Первым является конечная разрешающая сила микроскопа: образец, очевидно, не может иметь размеров меньших, чем предел разрешения микроскопической оптики. В видимой и ультрафиолетовой области спектра, где микроспектрофотометрические методы применяются уже давно, этот «дифракционный предел» довольно низок и равен примерно 0,5 μ , т. е. допускает исследование отдельных клеток и даже их частей. Очень сильное поглощение некото-

рых биохимических веществ в ультрафиолете позволило обнаружить их в клетках, где они имелись в количестве 10^{-19} г.

В инфракрасной области условия складываются менее благоприятно. Здесь вследствие большой длины волны «дифракционный предел» ограничивает минимальные размеры образца уже несколькими микронами. Однако и этот предел не может быть достигнут из-за ограничений энергетического характера. Для этого чтобы световой пучок перекрыл все зеркало коллиматора, необходимо, чтобы отношение численной апертуры микропಲ್ಲюминатора к численной апертуре монохроматора было равно

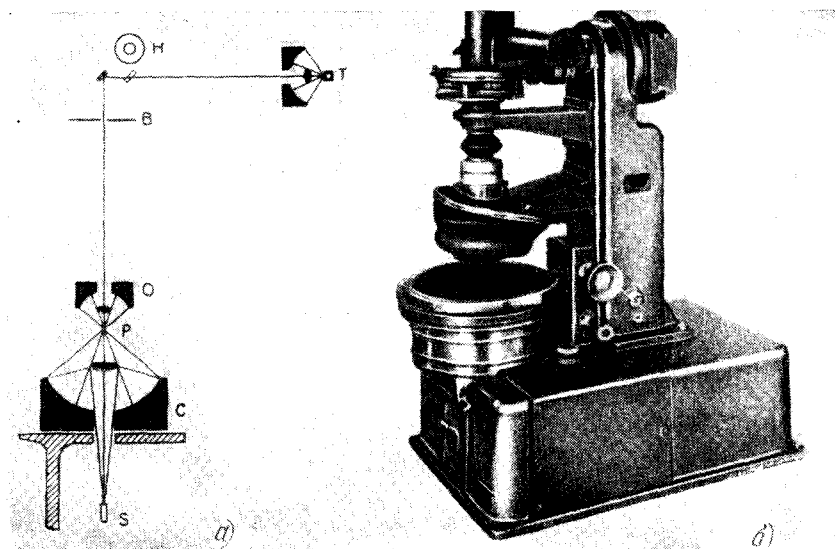


Рис. 17. Приспособление для инфракрасной микроспектрофотометрии фирмы Перкин—Эльмер: а—схема, б—внешний вид (21).

увеличению изображения образца на щели прибора. Так как численная апертура монохроматора равна примерно 0,1, а микропಲ್ಲюминатора—около 1, то увеличение должно быть равно примерно 10, т. е. энергетические требования ограничивают размеры образца значениями порядка $0,1 \times 1$ мм.

Указанный большой разрыв между «энергетическим» и «дифракционным» лимитированием размеров образца может быть несколько сокращен маскированием части площади образца за счет снижения разрешающей силы спектрального прибора, а также путем применения более интенсивных источников инфракрасного излучения и более чувствительных приемников. Подробности относящихся сюда расчетов можно найти в обзоре Вуда ²² и в статье Коатса, Оффнера и Зиглера ²³.

Практически в наиболее благоприятном случае, когда объектом служит удлиненное и тонкое волокно, удавалось получить достаточно хорошо разрешенный во всей области от 2,5 до 15 μ спектр поглощения образца диаметром в 17 и длиной в 650 μ . Это дает возможность регистрировать спектр вещества, имеющегося в количестве 10^{-7} г. Для образцов круглого сечения имеются данные об успешном исследовании их инфракрасных спектров при диаметре образца в 30 μ .

В силу указанных ограничений и слабости поглощения большинства компонент клетки в инфракрасной области, применения инфракрасной микроспектрофотометрии менее многочисленны, чем ее применения в

ультрафиолете. Тем не менее уже и сейчас имеется ряд интересных и важных результатов. Так, например, изучая инфракрасные спектры отдельных мышечных клеток, Вуд²⁴ показал, что в них отсутствует дихроизм. Это указывает, с одной стороны, на то, что сократительный механизм мышцы построен на уровне более высоком, чем элементарные полипептидные цепи, а с другой стороны, на то, что процесс сокращения мышцы сложнее, чем простое «складывание» полипептидных цепей.

В биохимических исследованиях применение методов инфракрасной микроспектрофотометрии представляется еще более перспективным, так как эти методы позволяют изучать спектры веществ, имеющих в минимальных количествах. Так, например, были получены спектры и проведена идентификация пропионилхолина—вещества, играющего важную роль в процессе нервного проведения,—в условиях, когда все количество этого вещества, имевшееся у экспериментатора, было равно 300 μg ^{25, 26}.

Несомненно, что разработка этих методик, выпуск соответствующей аппаратуры и развитие исследований в этой области является важной задачей для координированной работы советских физиков, приборостроителей и биологов.

5. Переходя от вопроса о составе и строении основных биологических субстратов к вопросу о применении спектроскопических методов для исследования механизма фундаментальных биологических процессов, нужно прежде всего отметить, что речь здесь, в первую очередь, будет идти о процессах фотобиологических в широком смысле этого слова, т. е. о процессах, в которых свет является агентом, вызывающим, стимулирующим или направляющим течение биохимических реакций. Сюда относятся такие важнейшие процессы, как фотосинтез и зрение, а также явления фототаксиса, фототропизмов и фотопериодизмов, разнообразные действия света на ферменты и бактерии, фотодинамическое действие, т. е. окисление биологических систем молекулярным кислородом, сенсibiliзируемое флуоресцирующими веществами, и ряд других важных процессов.

Возможность этих разнообразных «фотохимических» в широком смысле слова биологических действий видимого и ультрафиолетового излучения обусловлена прежде всего тем обстоятельством, что энергия фотонов этих видов излучения соответствует энергии типичных связей в тех органических соединениях, которые составляют материальный субстрат жизни. Значения энергии важнейших валентных связей в органических соединениях, таких как связи $\text{C} - \text{N}$, $\text{C} = \text{O}$, $\text{C} - \text{H}$ и др., лежат между 2 и 6 эв; диссоциация большинства ковалентных связей требует энергии около 2,5 эв, а более слабые связи, например водородные, характеризуются еще меньшими значениями энергии. Если мы вспомним, что излучению с длиной волны 2000 Å соответствует энергия фотона в 6,2 эв, то станет ясно, что поглощение ультрафиолетового и видимого излучения может, не ионизуя атомов и молекул, вызывать в них разрыв и перегруппировку связей, т. е. в широком смысле слова давать начало различным фотохимическим реакциям, ведущим к разнообразным и далеко идущим биологическим последствиям.

Наряду с такими фотохимическими превращениями в последнее время все больше выясняется огромное значение, которое имеют при протекании самых разнообразных биологических процессов возбужденные электронные состояния молекул. Этот вопрос подробно освещен в книгах Сент-Дьердьи²⁷ и Рида²⁸, которые выйдут скоро в свет в русских переводах, и я не буду останавливаться на нем подробнее, хотя о некоторых чертах концепции Сент-Дьердьи мне придется говорить в связи с вопросом о той роли, которую играет в биологических процессах способность молекул люминесцировать.

Из большого числа многообразных и перспективных применений спектроскопических методов в исследованиях, посвященных указанному кругу вопросов, я останавлиюсь лишь на тех, которые носят специфический характер или требуют разработки специальных методик и аппаратуры.

В первую очередь здесь следует указать на спектральные методы изучения тех короткоживущих промежуточных продуктов, которые возникают при фотохимических реакциях и затем либо входят в дальнейшую цепь темновых реакций, либо испытывают обратное превращение в исходный продукт. Длительность жизни таких промежуточных продуктов может варьировать от нескольких минут до малых долей секунды. Если они имеют химический характер свободных радикалов, то во многих случаях они могут успешно изучаться методом парамагнитного электронного резонанса, которому на нашем Совещании был посвящен ряд докладов. Однако это не обязательно. При фотосинтезе, например, промежуточными продуктами могут быть как восстановленная форма хлорофилла, так и его ионизованные формы или триплетные состояния, а также и другие промежуточные продукты, могущие являться предшественниками молекулярного кислорода, выделяемого растением. Во всех таких случаях основным методом изучения промежуточных продуктов является изучение тех изменений в спектре абсорбции, которые возникают при освещении исследуемого вещества.

«Разностный спектр», получаемый из сопоставления спектров освещенного и неосвещенного образца, можно рассматривать как спектральную характеристику промежуточного продукта и использовать для его идентификации, а изучение кинетики изменений абсорбции, возникающих после включения или выключения света, позволяет проследить за кинетикой прямых и обратных реакций возникновения и распада этих продуктов.

Описанный метод построения «разностных спектров» абсорбции освещенного и неосвещенного вещества был наиболее широко и эффективно применен к изучению фотохимических реакций хлорофилла как *in vitro*, так и в его естественном состоянии в фотосинтетическом аппарате растений.

По-видимому, впервые применил методику «разностных спектров» к изучению фотохимических реакций хлорофилла и его аналогов Красновский в 1948 г.²⁹ Он показал, что при кратковременном облучении красным светом растворов хлорофилла, его аналогов и производных в пиридине в присутствии аскорбиновой кислоты или других доноров водорода, в спектре абсорбции возникают характерные изменения, которые можно объяснить образованием фотопродуктов, обладающих максимумом поглощения в более коротковолновой области. При выключении света реакция быстро идет в обратном направлении, и первоначальный спектр абсорбции восстанавливается. Эти продукты представляют собой фотовосстановленную форму хлорофилла, которая согласно концепции Красновского играет решающую роль и в процессе фотосинтеза *in vivo*: она является по его представлению первичным звеном в сложной цепи окислительно-восстановительных реакций, конечным результатом которых является ассимиляция CO_2 и выделение кислорода. Разностные спектры, или спектры восстановленных форм хлорофилла, его аналогов и производных, полученные Красновским и его сотрудниками, приведены на рис. 18.

В 1952 г. Дьюзеппе³¹ обнаружил аналогичные изменения абсорбции, возникающие при освещении живого объекта — пурпурных фотосинтезирующих бактерий *Rhodospirillum rubrum* Chromatium, а несколько позже он и затем ряд других исследователей изучили такие же «разностные спектры» для одноклеточной зеленой водоросли *Chlorella* (рис. 20). Изменения спектра абсорбции зеленых листьев высших растений при освещении изучал в СССР Белл³³.

Интерпретация полученных спектров промежуточных продуктов очень затруднительна и во многом остается еще спорной, так как наблюдаемые изменения абсорбции могут быть обусловлены не только обратимым обра-

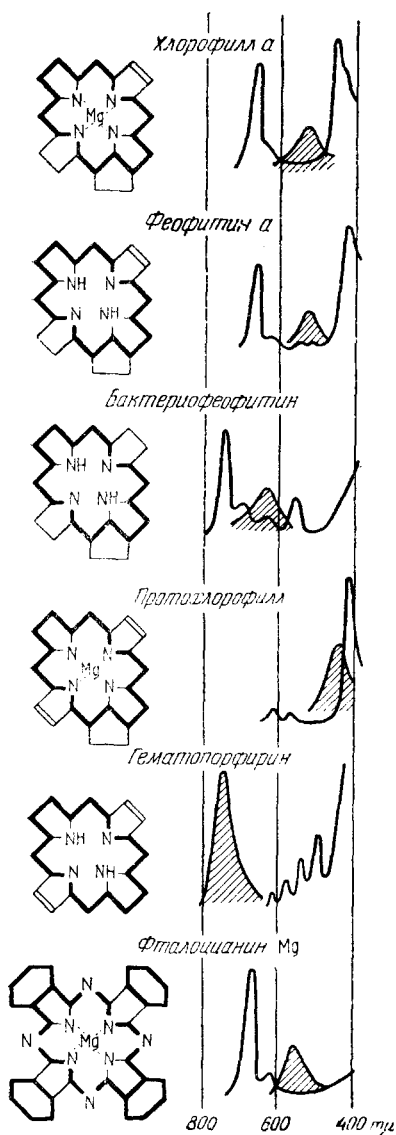


Рис. 18. Схематическое изображение структуры спектра поглощения хлорофилла, его производных и аналогов и спектра поглощения фото-восстановленных форм этих пигментов.

зованием фотовосстановленной формы хлорофилла, как это предполагал Красновский, но и переходом возбужденных молекул хлорофилла в длительно живущее триплетное состояние, которое, по мнению многих исследователей, в частности Дж. Франка ³⁴, играет решающую роль в процессе превращения поглощенной растением световой энергии в форму потенциальной химической энергии тех или иных соединений. Они могут обуславливаться также и окислением некоторых веществ либо до формы радикалов, либо до формы насыщенных соединений. Так, например, Дюйзенс ³⁵ приписывает ряд полос в разностном спектре хлореллы (рис. 19) окислению цитохромов, а другие—переходу некоторого пока не идентифицированного пигмента из «темновой» формы с максимумом поглощения около 478 mμ в «световую» с максимумом поглощения при 515 mμ.

Весь этот комплекс вопросов необычайно важен для выяснения механизма первичной фотохимической реакции в процессе фотосинтеза и неудивительно, что в последние годы он очень интенсивно изучался многочисленными группами исследователей (Ливингстон, Дюйзенс, Витт, Стрелер, Линч, Кольмен, Холт, Рабинович, Линшиц и др.). Ряд статей этих авторов, дающих полное представление о современном состоянии вопроса, можно найти в книге ³⁶.

Изменения оптической плотности живых объектов и растворов, связанные с образованием промежуточных продуктов, вообще говоря, очень невелики; они измеряются тысячными долями, как это можно видеть на рис. 19 и 20. Поэтому при изучении этих спектров обычно применяются двухлучевые спектрофотометры и специальные установки, дающие возможность исключить влияние рассеяния света, вызывающего фотохимическую реакцию, и флуоресценции.

Разнообразные экспериментальные установки, предложенные различными авторами для изучения спектров промежуточных продуктов, в основном могут быть разделены на два типа: 1) циркуляционные системы, в которых суспензия изучаемого вещества или раствор освещается в течение некоторого времени (от 5 до 60 сек) вне спектрофотометра и затем быстро

перекачивается в кювету, помещенную в измеряющем абсорбцию луче, и 2) системы, в которых освещение производится непрерывно, а измеряющий луч направляется через кювету в направлении, перпендикулярном пучку,

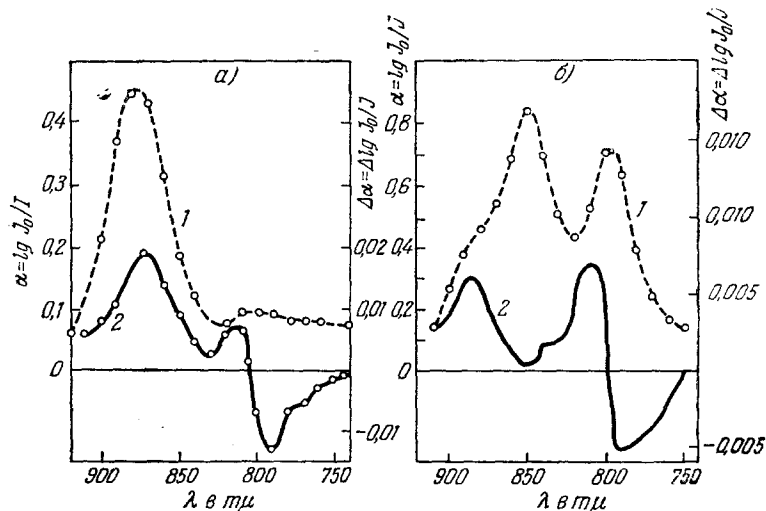


Рис. 19. Спектры абсорбции пурпурных бактерий и их изменения: а—*Rhodospirillum rubrum*, б—*Chromatium*. Спектры абсорбции в темноте—пунктирные кривые 1; масштаб по оси ординат слева. Изменения поглощения при освещении—сплошные кривые 2; масштаб увеличен и показан на оси ординат справа. По Дюйзену ³¹.

вызывающему реакцию. Схема типичной установки такого типа по Дюйзену показана на рис. 21. Так как возбуждающий свет значительно сильнее зондирующего луча, то для устранения рассеянного света и флуоресценции приходится прибегать к скрещенным фильтрам (f_2 и f_3 на рис. 21), применять модуляцию измеряющего света с последующим резонансным усилением фототока и детектированием с помощью фазовых детекторов и иногда относить спектрофотометр на большое расстояние от кюветы.

В последнее время в этих исследованиях широко применяются импульсные лампы, дающие чрезвычайно сильное кратковременное освещение объекта, с последующей временной разверткой тока фотоумножителя на осциллографе. Схема такой установки показана на рис. 22. Установки этого

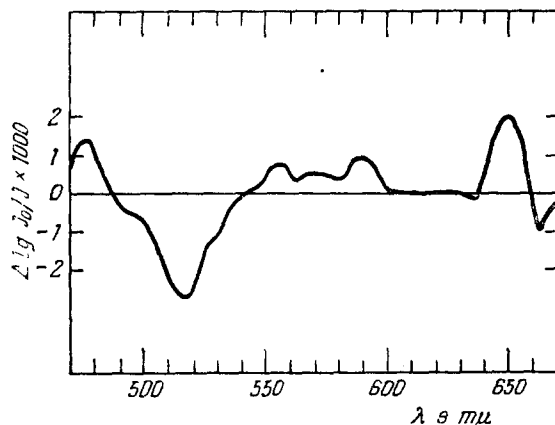


Рис. 20. Разностный спектр абсорбции освещенной и неосвещенной водоросли *Chlorella*. По Стрелеру и Лаугу ³².

типа дают возможность проследить за кинетикой образования промежуточных продуктов, начиная с 10^{-5} сек и до нескольких секунд.

В целом представляется несомненным, что описанный спектральный метод изучения промежуточных продуктов химических реакций является

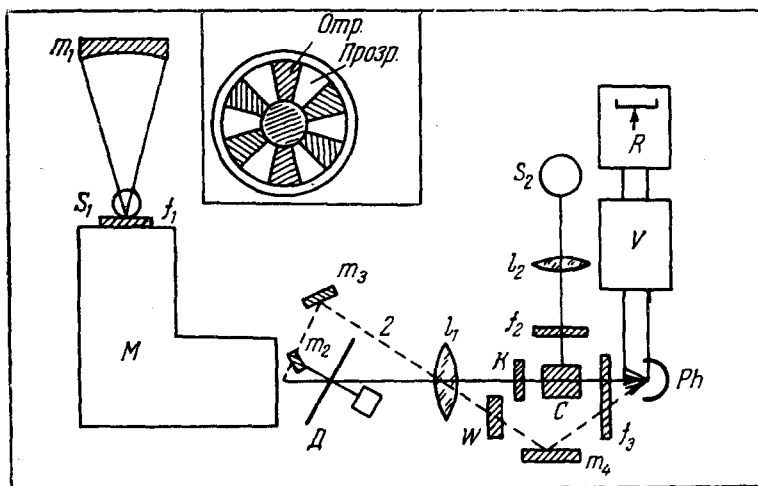


Рис. 21. Схема установки Дюизенса³⁷ для исследования разностных спектров при непрерывном освещении. S_1 и S_2 —источники света, m_1 —вогнутое зеркало, концентрирующее свет лампы S_1 на входной щели монохроматора M . Укрепленный на оси синхронного мотора диск D с чередующимися прозрачными и отражающими секторами (вид его спереди показан на рис. сверху) направляет измерительный луч, выходящий из монохроматора, поочередно, либо по прямому пути 1 через кювету C с освещаемой суспензией водорослей, либо, минуя эту кювету, по пути 2 с помощью зеркал m_2, m_3, m_4 ; Ph —фотоумножитель, V —усилитель фототока и фазово-чувствительный детектор, R —измерительный прибор, W —клин для уравнивания интенсивности сканирующих лучей, K —калибровочная проволоочная сетка, l_1, l_2 —линзы, f_1, f_2, f_3 —светофильтры.

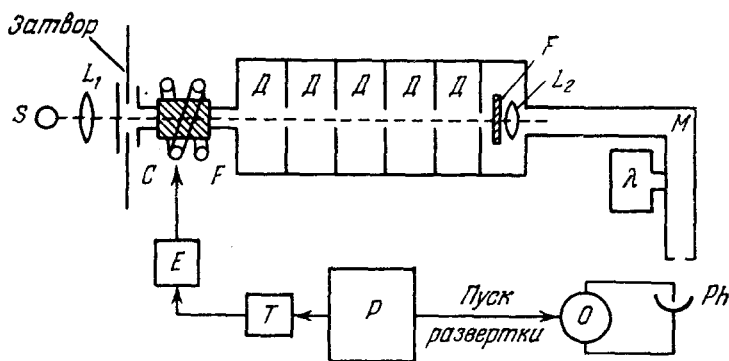


Рис. 22. Схема установки Линшцта и Абрамсона³⁸ для исследования изменений абсорбции при мгновенном освещении импульсной лампой. S —источник света, дающий измерительный луч, L_1 —коллимирующая линза, L_2 —линза, собирающая свет на щели монохроматора M , C —кювета с образцом, F —вспышечная лампа, имеющая вид двух витков спирали, окружающей образец, D —диафрагмы для устранения рассеянного света (расстояние между образцом и монохроматором равно 120 см), F —светофильтр, Ph —фотоэлектронный умножитель, O —осциллограф, P —генератор импульсов, T —триггерная схема для вспышки и линия задержки, E —источник энергии. Лампа работала при напряжении 4 кВ и емкости 24 мФ и давала вспышку длительностью в 100 микросекунд.

чрезвычайно перспективным и может дать весьма ценные результаты при исследовании не только фотосинтеза и других фотобиохимических процессов, но и многих темновых химических и биохимических процессов. Здесь также открывается широкое поле для плодотворной совместной работы физиков, химиков и биологов.

6. Другим, очень важным направлением в развитии спектроскопических методов исследования биологических процессов является изучение так называемых спектров действия и их сопоставление с спектрами абсорбции. Под спектром действия излучения мы разумеем график или функцию, дающую зависимость эффективности излучения для изучаемого процесса от частоты или длины волны этого излучения. В этом определении нужно прежде всего подчеркнуть слова «для изучаемого процесса». Действия света настолько разнообразны и специфичны, что, очевидно, не имеет смысла сопоставлять эффективность действия излучения для таких процессов, как, скажем, фотосинтез и зрение или бактерицидное действие и фототропизм и т. п.

Однако и с этой оговоркой понятие «биологической эффективности» определенного излучения нуждается в более точном определении. Феноменологически мы всегда изучаем скорость изменения той или иной величины M , количественно характеризующей данный биологический эффект. Под M можно, например, разумеать количество ассимилированного в процессе фотосинтеза CO_2 или выделенного кислорода, количество пигмента, обуславливающего «загар» кожи, численность бактерий в популяции, подвергающейся облучению, величину, характеризующую инактивацию того или иного фермента, и т. п. Вообще говоря, скорость изменения этой величины dM/dt меняется со временем и зависит не только от интенсивности и частоты излучения, но и от целого ряда других факторов: физиологических условий, в которых находится объект, состава и рН окружающей среды, температуры, длительности облучения и темновой паузы и т. д. Если *ceteris paribus*, т. е. при неизменности всех этих условий, мы устанавливаем, что одинаковые значения dM/dt достигаются при интенсивности I_1 излучения с длиной волны λ_1 и интенсивности I_2 излучения с длиной волны λ_2 , то относительная биологическая эффективность этих двух излучений может быть определена как величина, обратная отношению этих интенсивностей:

$$\frac{\text{относит. эффективн. } \lambda_1}{\text{относит. эффективн. } \lambda_2} = \frac{I_2}{I_1}.$$

Важно отметить, что это определение имеет реальный смысл лишь в том случае, когда это отношение имеет одно и то же значение для любого момента времени как при освещении объекта, так и после прекращения действия света, что в каждом отдельном случае подлежит проверке и не всегда имеет место.

В основе всякого биологического действия излучения лежит та или иная «фотохимическая» в широком смысле слова реакция, т. е. возникновение тех или иных изменений в поглотившей квант излучения молекуле. Однако связь между этой первичной реакцией и наблюдаемым биологическим эффектом обычно очень сильно опосредствована. Между актом поглощения света и возникновением окончательного эффекта обычно разыгрывается большое число сложнейших и взаимосвязанных химических и биологических реакций. Более того, возможны случаи, когда один и тот же биологический эффект связан с поглощением света различными молекулами или с различными изменениями, происходящими под действием света в одной и той же молекуле.

Мы будем рассматривать только простейший случай, когда это не имеет места, и интересующий нас эффект определяется только определенным «повреждением», происшедшим под влиянием света в определенных молекулах. Тогда, очевидно, наблюдаемый нами макроскопический эффект есть некоторая сложная и специфичная для данного процесса функция от скорости изменения числа «поврежденных» молекул (N^*):

$$\frac{dM}{dt} = g \left(\frac{dN^*}{dt} \right).$$

Вероятность возникновения данного «повреждения» есть произведение вероятности поглощения кванта света данной молекулой и вероятности того, что в результате поглощения произойдет требуемая реакция. Первую вероятность в биологических работах обычно характеризуют не молярным коэффициентом экстинкции, как это принято в химии, а величиной «поперечного сечения захвата» кванта s , которая связана с коэффициентом экстинкции простым соотношением:

$$s_{(\text{см}^2/\text{молекула})} = 3,83 \cdot 10^{-21} \varepsilon_{(\text{моль/л})}.$$

Вероятность данной реакции в поглотившей квант молекуле, т. е. величина

$$\Phi = \frac{\text{число прореагировавших молекул}}{\text{число поглощенных квантов}}$$

называется квантовым выходом данной реакции.

Если интенсивность освещения мы будем выражать не в энергетических единицах (*мощность/см²*), а числом квантов на кв. см в сек, то, очевидно,

$$\frac{dN^*}{dt} = \Phi \cdot s \cdot I \cdot N,$$

где N —общее число молекул данного рода в освещаемом объекте, и

$$\frac{dM}{dt} = g (\Phi \cdot s \cdot I \cdot N).$$

Из данного выше определения относительной биологической эффективности излучения с длиной волны λ следует, что при этих условиях отношение $I_2 : I_1$ равно обратному отношению произведений $\Phi \cdot s$, т. е.

$$\frac{\text{относит. эффективн. } \lambda_1}{\text{относит. эффективн. } \lambda_2} = \frac{\Phi_1 \cdot s_1}{\Phi_2 \cdot s_2}.$$

Отсюда легко видеть, что в том случае, когда квантовый выход данной реакции не зависит от длины волны поглощаемого света, спектр действия должен совпадать по форме со спектром поглощения вещества, в котором происходит первичная фотохимическая реакция. Обратно, совпадение спектра действия со спектром действия того или иного вещества, имеющегося в системе, показывает, во-первых, что именно это вещество играет роль начального звена по всей цепи биологических реакций, приводящих к данному эффекту, и, во-вторых, что квантовый выход первичной фотохимической реакции не зависит от длины волны поглощаемого света.

Такого рода совпадения спектра действия биологического эффекта со спектрами поглощения определенных веществ известны уже давно. Известно, например, что кривая чувствительности скотопического (сумеречного) зрительного аппарата человека прекрасно совпадает со спектром поглощения зрительного пурпура, пигмента, содержащегося в окончаниях зрительного нерва—палочках. Это совпадение является основой

фотохимической теории зрения. Напротив, невозможность отыскать в глазу пигменты, спектры абсорбции которых совпадали бы по форме с кривыми спектральной чувствительности трех фундаментальных цветовых рецепторов, требуемых трехцветной теорией цветового зрения Юнга—Гельмгольца, является одним из наиболее серьезных возражений против чисто фотохимической теории цветного зрения и заставляет искать иных объяснений этого явления.

Равным образом, при изучении спектра действия фотосинтеза в зеленых растениях, содержащих в качестве активного пигмента только хлорофилл, удалось показать, что этот спектр вполне удовлетворительно совпадает со спектром абсорбции хлорофилла (рис. 23), и это является наиболее убедительным доказательством того, что в этих случаях первичным звеном цепи реакций фотосинтеза является поглощение света молекулами хлорофилла.

Однако сколь ни интересны сами по себе такие случаи совпадения спектра действия со спектром абсорбции фотохимически активного вещества, еще больший интерес представляют случаи, когда такое совпадение не имеет места. При изучении, например, фотосинтеза в сине-зеленых водорослях, содержащих, кроме хлорофилла, еще и другой пигмент—фикоцианин, было показано, что свет, поглощаемый этим пигментом, столь же эффективен и для фотосинтеза и для возбуждения люминесценции хлорофилла, как и свет, поглощенный самим хлорофиллом. На рис. 24 показаны спектры

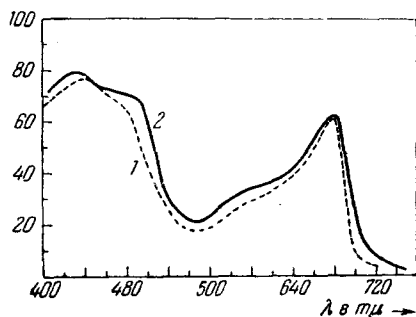


Рис. 23. Спектр действия фотосинтеза (кривая 1) и спектр абсорбции (кривая 2) для зеленой водоросли *Ulva taciata*. По Гексо и Блинкесу³⁹.

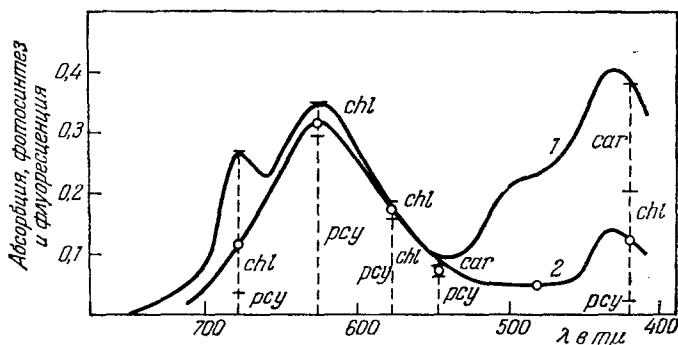


Рис. 24. Спектры абсорбции (кривая 1) и спектр действия фотосинтеза (кривая 2) для сине-зеленой водоросли *Oscillatoria* по Дьюизенсу³¹.

абсорбции и спектр действия сине-зеленой водоросли *Oscillatoria*. На последней кривой кружками отмечены для ряда длин волн значения относительной эффективности излучения для возбуждения флуоресценции хлорофилла в растении. Черточки на ординатах при этих длинах волн указывают относительную долю энергии, которая поглощается фикоцианином, хлорофиллом и каротиноидами. Можно видеть, например, что в длине волны около 680 $m\mu$ подавляющая доля излучения (свыше 90%) поглощается хлорофиллом, тогда как в длинах волн около 650 или 580 $m\mu$ почти все излучение

поглощается фикоцианином. Тем не менее эффективность поглощенного света как для фотосинтеза, так и для флуоресценции хлорофилла одинакова. Это указывает на то, что в хлоропластах растения имеет место миграция энергии от фикоцианина к хлорофиллу, т. е. передача энергии возбуждения молекул фикоцианина молекулам хлорофилла без диссипации и на расстояния, значительно превышающие межатомные; кинетические соударения между донором и акцептором энергии при этом исключены. На том же рисунке отмечена и доля света, поглощаемая каротиноидами. Это поглощение особенно значительно в синей части спектра около 400 *mμ*. Как видно из рисунка, передача энергии, поглощенной каротиноидами, к хлорофиллу в данном случае не имеет места, и этот свет не участвует ни в фотосинтезе, ни в возбуждении флуоресценции хлорофилла.

Приведенный пример является далеко не единственным случаем явления миграции энергии, т. е. безызлучательной передачи энергии возбуждения от места поглощения к месту потребления. Эти явления, по-видимому, очень широко распространены в биологических процессах, и выяснение их механизма имеет чрезвычайно важное значение для понимания этих процессов. Им уделяется поэтому очень много внимания в современной физико-химической биологии. Не будучи в состоянии останавливаться на этих интереснейших явлениях подробнее я укажу лишь на книгу Рила ⁴⁰, ряд обзоров Теренина ⁴¹⁻⁴³ и обзор Владимирова и Конева ⁴⁴, посвященный специально вопросу о миграции энергии в молекуле белка. Мне хочется только подчеркнуть, что при изучении явлений миграции энергии спектральные методы и, в частности, изучение спектров действия являются одним из важнейших, а часто и единственным орудием исследования.

7. Все сказанное выше относилось только к абсорбционным методам спектроскопии. Мы должны еще вкратце остановиться и на методах эмиссионных. Как уже было отмечено, из этих методов в биологических и биохимических исследованиях наибольшее значение имеет изучение фотолюминесценции и хемолюминесценции отдельных биологических веществ и живых объектов.

Я совершенно не буду касаться при этом многочисленных и важных применений люминесцентного анализа и люминесцентной микроскопии, которым посвящен ряд специальных книг и обзоров (см., например, ^{45,46}) и задержу Ваше внимание лишь на некоторых специфических применениях люминесцентных методов к исследованию важных биологических процессов.

Я хотел бы при этом отметить одно общее обстоятельство. Многие люминесцирующие биологически важные вещества являются не только сложными по своему химическому составу, но и «сложными» в том специально люминесцентном смысле, который придал этому слову Б. С. Непорент. Это означает, что в них имеется большое число внутренних колебательно-вращательных степеней свободы, настолько тесно связанных с электронными возбужденными состояниями, что равновесное распределение возбужденных молекул по колебательно-вращательным уровням энергии успеваеt установиться за время, значительно меньшее, чем длительность пребывания молекул в возбужденном состоянии. Вследствие этого спектры люминесценции этих «сложных» молекул имеют вид широких бесструктурных полос, форма которых не характерна для данного вещества. Степанов ⁴⁷ показал, что форма спектра таких молекул является универсальной; различно лишь положение максимума, определяемое энергетическим расстоянием между соответствующими электронными уровнями.

Правда, при определенных условиях, как показал Э. В. Шпольский (см. его статью на стр. 51), удается разрешить спектры некоторых соединений в ряд столь узких полос, почти спектральных линий, что

становится возможным проведение колебательного анализа структуры этих веществ. Несомненно, что этот прием может дать ценные результаты и при исследовании биологически важных веществ. Однако в большинстве случаев при изучении люминесценции живых объектов и биологических веществ в обычных условиях мы имеем дело с широкими, бесструктурными и малохарактерными спектрами люминесценции. Конечно, чисто спектральное изучение таких спектров тоже может дать ценные указания для понимания происходящих в организме процессов или для выяснения состояния, в котором находится люминесцирующее вещество. Так, много важных результатов было получено при сопоставлении спектров люминесценции хлорофилла в растворах и в клетках растений. Однако можно думать, что изучение люминесценции биологических объектов и веществ может дать наиболее ценные результаты, если не ограничиваться только установлением спектрального распределения интенсивности этого излучения, но привлечь к рассмотрению и другие его характеристики: выход, поляризацию и длительность свечения, а также закон его затухания.

Я ограничусь лишь несколькими примерами, иллюстрирующими эффективность таких расширенных—не чисто спектральных—методов изучения люминесценции. Арнольд и Мик⁴⁸ показали, что люминесценция хлорофилла в клетках растений (водоросль хлорелла) практически деполяризована (степень поляризации ее не превышает 3%), тогда как при том же возбуждении поляризация люминесценции растворов хлорофилла в касторовом масле превышала 25%. Мы имели возможность убедиться в том, что и поляризация флуоресценции изолированных хлоропластов, выделенных из листьев свеклы и табака, также почти деполяризована ($p \approx 2\%$). Так как вязкость хлорофилл-протеиновых комплексов в гранах практически бесконечна, а длительность возбужденного состояния значительно меньше, чем в растворах, то возможность деполяризации флуоресценции за счет броуновского поворота молекул за время возбужденного состояния исключена, и единственное возможное объяснение этого явления заключается в том, что в растении имеет место концентрационная деполяризация, т. е. перенос энергии от возбужденной светом молекулы хлорофилла к другой. Эти результаты являются, таким образом, весьма веским аргументом в пользу концепции так называемой «фотосинтетической единицы»—комплекса из нескольких тысяч молекул хлорофилла, связанных с одним «реакционным центром» и участвующих в фотосинтезе как одно целое.

Флуоресценция рибофлавина исследовалась весьма интенсивно с целью определения этого вещества, но при этом обычно ограничивались только измерениями интенсивности и спектра свечения. Г. Вебер⁴⁹ исследовал поляризацию этого свечения и получил ряд весьма важных новых результатов. Он показал, например, что тушение флуоресценции рибофлавина различными пуринами (аденозин, кофеин и др.) не сопровождается сокращением длительности возбужденного состояния и, стало быть, может быть объяснено только образованием нефлуоресцирующих комплексов рибофлавина с этими веществами. Из температурных опытов Вебер сумел определить и теплоту диссоциации этих комплексов. Аналогичные измерения дали Веберу возможность установить, что длительность возбужденного состояния молекул рибофлавина не меняется при включении их в комплекс: флавин—адениндинуклеопротейд.

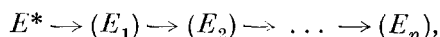
Большой интерес представляет также разработанный Вебером⁵⁰ метод изучения формы и размеров макромолекул (белков) по поляризации флуоресценции адсорбированных на них молекул красителей. Пользуясь этим методом, Масси, Харрингтон и Хартли⁵¹ обнаружили физические различия между хитотрипсином и хитотрипсиногеном.

Наконец, последний пример. Известно, что выход флуоресценции хлорофилла в растворе достигает значений 25—30%, тогда как в растении он значительно ниже (2—3%)⁵². Недавно, независимо друг от друга, тремя авторами⁵³⁻⁵⁵ были произведены прямые измерения длительности возбужденного состояния хлорофилла *in vitro* и *in vivo* и было показано, что уменьшение выхода флуоресценции в растениях сопровождается параллельным сокращением ее длительности. Это показывает, что в возбужденном состоянии молекулы хлорофилла в растении происходит конкуренция между обычными путями дезактивации молекулы путем излучения или внутренней конверсии, с одной стороны, и тем специфическим путем ее дезактивации, который приводит к запасанию поглощенной энергии света в виде энергии химических продуктов фотосинтеза, с другой стороны. Можно думать, что началом этого пути является переход молекул хлорофилла из синглетного состояния в долгоживущее, метастабильное, триплетное состояние. Весь этот комплекс вопросов сейчас разрабатывается очень интенсивно и, можно думать, что эти работы приведут нас к лучшему пониманию первичных, фотохимических стадий этого процесса.

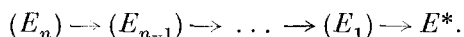
В заключение я хотел бы еще сказать несколько слов об общей концепции биоэнергетических процессов, развиваемой Сент-Дьердьи, и, в связи с этим, о роли способных люминесцировать молекул в биологических процессах.

Основным в концепции Сент-Дьердьи является положение о том, что переход энергии, запасенной в потенциальной форме в связях того или иного химического соединения, в лабильные, кинетические формы энергии жизнедеятельности происходит через возбужденные электронные состояния тех или иных молекул.

Если энергию, запасенную в химических связях, мы будем обозначать через (E), а энергию возбужденных электронных состояний через E^* , то процесс фотосинтеза можно схематически записать в виде:



а все другие биоэнергетические процессы, в которых эта химическая энергия переходит в формы энергии жизнедеятельности по Сент-Дьердьи могут быть записаны в виде



«Вся жизнь,—пишет Сент-Дьердьи,—есть фотосинтез и его обращение». При этом реакции типа $(E_k) \rightarrow (E_{k+1})$ — это обычные химические реакции промежуточного метаболизма, при которых энергия переходит от связи к связи, от вещества к веществу. Они могут быть понаты в рамках классической химии и записаны в виде комбинаций букв, символизирующих атомы, и черточек, символизирующих связи. Что же касается процессов типа $E^* \rightarrow (E_1)$ или $(E_1) \rightarrow E^*$, то это специфические, «квантовобиологические» процессы, механизм которых сейчас еще не ясен и подлежит изучению. Первые переходы составляют ядро всех процессов, в которых аккумулируется энергия и создается живая материя, а вторые составляют ядро всех процессов, в которых эта энергия приводит в действие живую машину.

Специфической особенностью люминесцирующих молекул является то, что в них энергия возбуждения может задерживаться на время порядка 10^{-8} — 10^{-9} сек, тогда как в молекулах не люминесцирующих обмен энергии возбуждения по колебательно-вращательным степеням свободы и превращение ее в тепло происходят за время значительно меньшее, порядка 10^{-14} сек. Возможность превращения энергии электронного возбуждения в химическую в процессах типа $E^* \rightarrow (E)$, равно как и возможность превращения энергии E^* в энергию жизнедеятельности, например в меха-

ническую работу при сокращении мышцы, очевидно, значительно больше в случае молекул способных люминесцировать. Именно такие молекулы и должны, по мнению Сент-Дьердьи, играть решающую роль в биоэнергетических процессах.

Это, конечно, не означает, что эти молекулы фактически люминесцируют в тех условиях, в которых они находятся в организме. Напротив, в большинстве случаев процессы биологического использования энергии возбуждения конкурируют с процессом спонтанного высвечивания настолько успешно, что фактически люминесценция отсутствует или имеет очень малый выход. Мы видели, например, что выход флуоресценции хлорофилла в клетке раз в десять меньше, чем в растворе.

У большинства люминесцирующих молекул, помимо обычного синглетного возбужденного состояния, характеризующегося указанными выше значениями длительности, существует и метастабильное триплетное состояние, в котором вероятность спонтанного высвечивания на несколько порядков величины меньше: соответственно длительность этих состояний во столько же раз больше. С химической точки зрения эти молекулы с двумя параллельными электронными спинами представляют собой бирадикалы и характеризуются высокой реакционной способностью. Оба эти обстоятельства—высокая реакционная способность и большая длительность жизни—чрезвычайно благоприятствуют переходу энергии возбуждения в форму химической энергии. Теренин впервые обратил внимание на эти обстоятельства и подчеркнул важное значение, которое имеют триплетные возбужденные состояния во всех фотохимических процессах, в частности, в фотосинтезе и других фотобиологических процессах. Сент-Дьердьи распространяет эту точку зрения и на все остальные биоэнергетические процессы и считает, что первым шагом на пути превращения энергии электронного возбуждения, в механическую работу или в иные формы энергии жизнедеятельности является переход из синглетного возбужденного состояния в метастабильное триплетное. Этот переход в условиях организма становится, по Сент-Дьердьи, возможным благодаря тому, что вода в клетке, адсорбированная на разветвленных макромолекулах и структурах, в значительной своей части является структурированной, псевдокристаллической (см. по этому поводу обзор Привалова ⁵²).

Концепция Сент-Дьердьи пока еще является в большой мере гипотетической и нуждается в проверке и обосновании. Однако независимо от того, в какой мере она во всей своей универсальности подтвердится, не подлежит сомнению, что в очень многих процессах, в частности в фотосинтезе, роль электронных возбужденных состояний, в том числе и триплетных, является ведущей. В изучении этого интереснейшего комплекса вопросов, ведущего нас к выяснению биоэнергетических основ жизни, роль всестороннего изучения процессов люминесценции—включая сюда как чисто спектральное изучение этого свечения, так и изучение других его характеристик—выхода, поляризации, кинетики—несомненно будет очень велика.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. V. M. Ingram, *Nature* (London) **178**, 792—794 (1956); *British Medical Bulletin* **15**, 27 (1958).
2. M. F. Morales a. L. P. Cecchini, *I. Cellul a. Comp. Physiol* **37**, 107—135 (1951).
3. I. Leconte, *Handb. der Physik*, т. 26, стр. 586 (1958).
4. R. Wegmann, *Acta Historhemica* **4**, 244 (1957).
5. B. Thorell, *Studies on the formation of cellular substances during blood cell production* **2**, 1947.
6. W. Sandritter, *Acta histochemica* **4**, 276 (1957).

7. Н. Маслаковец, *Zeits. f. Phys.* **51**, 696—706 (1928).
8. U. Schiedt u. H. Reinwein, *Zeits. Naturforsch.* **7B**, 270—277 (1952).
9. U. Schiedt, *Zeits. Naturforsch.* **8B**, 66—70 (1953); *Appl. Spectroscopy* **7**, 75—84 (1953).
10. M. M. Stimson a. Mc. O'Donnel, *J. Am. Chem. Soc.* **74**, 1805—1808 (1952).
11. W. B. Mason a. H. N. van Slyke, *Spectrochimica Acta* **9**, 169 (1957).
12. B. M. Mitzner, *Ann. Chem.* **28**, 1801 (1956).
13. H. Ioshinaga a. K. A. Ortjen, *J. Opt. Soc. Amer.* **45**, 1085 (1955).
14. C. Clark a. M. Chianta, *Annals of the New York Ac. Sc.* **69**, 205 (1957).
15. M. Rogoff, *Annals of the New York Ac. Sc.* **69**, 27 (1957).
16. M. Rogoff a. T. F. Gallagher, *IRE National Convention Record*, 1958, part. 9, 50.
17. A. R. K. Cole a. Jones R. N., *J. opt. Soc. Am.* **42**, 348 (1952).
18. D. K. Anderson a. N. B. Woodall, *Ann. Chem.* **25**, 1906 (1953).
19. C. R. Burch, *Proc. Phys. Soc. London* **59**, 41 (1947).
20. R. Barer, A. R. H. Cole a. H. W. Thompson, *Nature (London)* **163**, 198 (1949).
21. G. O. Brunner, *Acta histochemica* **4**, 200 (1957).
22. D. L. Wood, *Annals of the New York Ac. Sc.* **69**, 194 (1957).
23. V. I. Coates, A. Offner a. E. H. Siegler, jr. *T. Opt. Soc. Am.* **43**, 984 (1953).
24. D. L. Wood, *Science* **114**, 36 (1951).
25. D. L. Wood, *Biochem J.* **58**, 30 (1954).
26. J. E. Gardiner a. V. P. Whittaker, *Biochem J.* **58**, 24 (1954).
27. A. Szent-Györgyi, *Bioenergetics*, N. Y. 1957.
28. C. Reid, *Excited states in chemistry a. biology*, L., 1957.
29. А. А. Красновский, *ДАН СССР* **60**, 421 (1948).
30. А. А. Красновский, *Журнал физич. химии XXV*, 968 (1956).
31. L. N. M. Duysens, *Transfer of excitation energy in photosynthesis*, Utrecht, 1952.
32. B. L. Strehler a. V. H. Lynch, в книге *Research in Photosynthesis*³⁶, стр. 89.
33. Л. Н. Белл, *ДАН СССР* **107**, 329 (1956).
34. J. Franck, в книге *Research in Photosynthesis*³⁶, стр. 19.
35. L. N. M. Duysens, *Science* **120**, 353 (1954).
36. «Research in Photosynthesis» ed. H. Gaffron et al. (Материалы конференции по фотосинтезу в Гаттинбурге), N. Y., 1957.
37. L. N. M. Duysens, в книге «Research in Photosynthesis»³⁶, стр. 59.
38. H. Linschitz a. E. W. Abrahamson, в книге «Research in Photosynthesis»³⁶, стр. 31.
39. F. T. Нахо a. L. R. Blinks, *J. Gen. Physiol* **33**, 389 (1950).
40. Н. Риль, *Миграция энергии*, М.—Л., 1948.
41. А. Н. Теренин и А. А. Красновский, *УФН* **37**, 65 (1949).
42. А. Н. Теренин, *УФН* **43**, 367 (1951).
43. А. Н. Теренин и В. Л. Ермолаев, *УФН* **58**, 37 (1956).
44. Ю. А. Владимиров и С. В. Копев, *Биофизика II*, 3 (1957).
45. М. А. Константинова-Шлезингер, *Люминесцентный анализ (в печати)*.
46. М. Н. Мейсель, *Люминесцентная микроскопия*, М.—Л., 1954.
47. Б. Н. Степанов, *Люминесценция сложных молекул*, Минск, 1955.
48. W. Arnold a. E. S. Meeke, *Arch. of Biochem. a. Biophys.* **60**, 80 (1956).
49. G. Weber, *Biochem J.* **47**, 114 (1952).
50. G. Weber, *Biochem J.* **51**, 145, 155 (1952).
51. V. Massey, W. F. Harrington a. B. S. Hartley, *Disc. Faraday Society* **20**, 24 (1955).
52. P. Latimer, T. T. Bannister a. E. Rabinowitch, *Science* **119**, 585 (1955).
53. E. Rabinowitch, *Science* **125**, 3248 (1957).
54. А. Н. Теренин, *ДАН СССР* **117**, 605 (1957).
55. Л. А. Тумерман, *ДАН СССР* **117**, 605 (1957).
56. И. Л. Привалов, *Биофизика II*, 854 (1958).