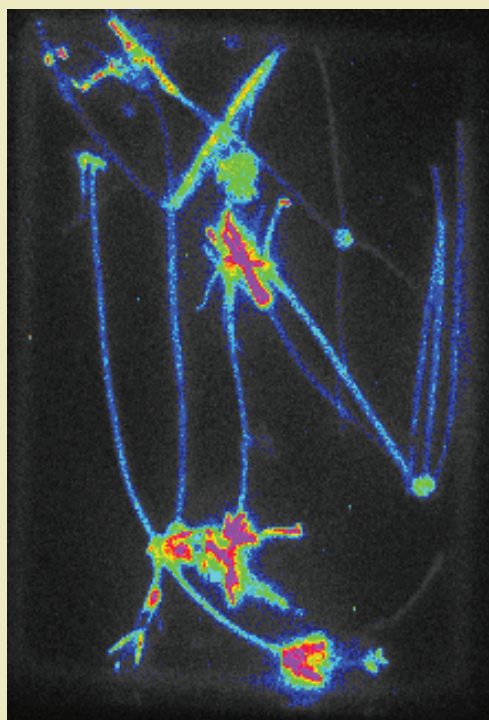




*Robert Borc, Anna Jaśkowska, Andrzej Dudziak*

# Ultraślaba emisja fotonowa z układów żywych



Lublin 2015

MONOGRAFIE

Ultraślaba emisja fotonowa  
z układów żywych

# Monografie – Politechnika Lubelska



Politechnika Lubelska  
Wydział Inżynierii Środowiska  
ul. Nadbystrzycka 40B  
20-618 Lublin

Politechnika Lubelska  
Wydział Elektrotechniki i Informatyki  
ul. Nadbystrzycka 38A  
20-618 Lublin

Robert Borc  
Anna Jaśkowska  
Andrzej Dudziak

# Ultraślaba emisja fotonowa z układów żywych



Politechnika Lubelska  
Lublin 2015

Recenzent:

Prof. dr hab. Edward Śpiewła

Publikacja wydana za zgodą Rektora Politechniki Lubelskiej

© Copyright by Politechnika Lubelska 2015

ISBN: 978-83-7947-164-5

Wydawca: Politechnika Lubelska

ul. Nadbystrzycka 38D, 20-618 Lublin

Realizacja: Biblioteka Politechniki Lubelskiej

Ośrodek ds. Wydawnictw i Biblioteki Cyfrowej

ul. Nadbystrzycka 36A, 20-618 Lublin

tel. (81) 538-46-59, email: wydawca@pollub.pl

[www.biblioteka.pollub.pl](http://www.biblioteka.pollub.pl)

Druk: TOP Agencja Reklamowa Agnieszka Łuczak

[www.agencjatop.pl](http://www.agencjatop.pl)

---

Elektroniczna wersja książki dostępna w Bibliotece Cyfrowej PL [www.bc.pollub.pl](http://www.bc.pollub.pl)

Nakład: 100 egz.

## Spis treści

Wstęp .....	11
1. Zjawiska emisji fotonowej .....	14
2. Źródła ultrasłabej emisji fotonowej w układach żywych.....	18
3. Stosowane metody i techniki pomiarowe .....	23
3.1. Metoda zliczania pojedynczych fotonów .....	23
3.2. Pomiar rozkładu spektralnego ultrasłabej luminescencji .....	27
3.3. Obrazowanie ultrasłabej luminescencji.....	30
4. Charakterystyka i preparatyka badanego materiału .....	34
4.1. Rośliny <i>Nitellopsis obtusa</i> .....	34
4.2. Przygotowanie roślin do badań .....	36
4.3. Izolowanie cytoplazmy, chloroplastów oraz ścianek komórkowych..	38
4.4. Otrzymywanie frakcji błonowych i rybosomalnych .....	38
5. Spontaniczna emisja fotonowa z wybranych układów żywych na przykładzie roślin <i>Nitellopsis obtusa</i> .....	40
5.1. Luminescencja opóźniona .....	40
5.2. Luminescencja ultrasłaba (USL) – nieindukowana emisja fotonowa.	45
5.2.1. Zależność intensywności USL od ilości komórek.....	45
5.2.2. Zależność intensywności USL od okresu wegetacji.....	46
5.2.3. Oscylacyjny charakter USL.....	51
5.2.4. Rozkład spektralny USL.....	54
6. Zmiany ultrasłabej emisji fotonowej wywołane przez antyoksydanty .....	57
6.1. Wpływ kwasu askorbinowego .....	57
6.2. Wpływ $\alpha$ - tokoferolu i $\beta$ -karotenu .....	71
7. Zmiany ultrasłabej emisji fotonowej indukowane wahaniami temperatury ..	77
8. Zmiany ultrasłabej emisji fotonowej wywołane przez anestetyki lokalne.....	88
9. Podsumowanie .....	99
10. Bibliografia .....	101
Aneksy	

## Streszczenie

Zjawisko ultrasłabej emisji fotonowej z układów żywych wciąż przykuwa uwagę człowieka ze względu na uniwersalność występowania w przyrodzie jak i stosowane metody pomiarowe, które są całkowicie nieinwazyjne wobec badanego obiektu.

Spontaniczne ultrasłabe promieniowanie elektromagnetyczne (niewidoczne gołym okiem) towarzyszy w sposób nieprzerwany materii żywej i odzwierciedla procesy metaboliczne w komórkach, które wiążą się z reakcjami wolnorodnikowymi. W stanie niezaburzonym obiektu żywego stacjonarna ultrasłaba emisja fotonowa odzwierciedla stan równowagi oksydoredukcyjnej komórki, natomiast zmiany natężenia tej emisji oraz tempo tych zmian są skorelowane z odpowiedzią komórek na zadany bodziec z otoczenia.

W monografii omówiono techniki pomiarowe ultrasłabej emisji fotonowej metodą zliczania pojedynczych fotonów (Single Photon Counting – SPC) przy użyciu fotopowielacza oraz metodą obrazowania luminescencyjnego za pomocą matrycy CCD uzyskując obrazy przestrzenno-czasowe z obiektów biologicznych (metoda Single Photon Counting Imaging – SPCI). Rozkład spektralny ultrasłabej luminescencji (USL) uzyskano metodą SPC dzięki zastosowaniu filtrów granicznych (cut-off filters).

Ultrasłabą spontaniczną emisję fotonową z glonów Characeae (gat. *Nitellopsis obtusa*), otrzymuje się po dłuższym okresie trwania tzw. luminescencji opóźnionej chlorofilu (3,5–6 h). Rośliny te, znane jako modelowe obiekty w badaniach elektrofizjologicznych, wykazały zależność ultrasłabego promieniowania elektromagnetycznego od okresu wegetacji. Promieniowanie to przejawiało charakter oscylacyjny w 10% badanych próbek. Z rozkładu spektralnego emisji wynika, że głównymi emiterami promieniowania są dimole tlenu singletowego, grupy karbonylowe oraz chlorofil, który mimo wyciemnienia roślin, "świeci" na skutek zaabsorbowania energii od wzbudzonych chemicznie cząsteczek.

Do próbek z roślinami, ich substrukturami (wyizolowana cytoplazma, ścianki komórkowe i wyodrębnione chloroplasty) oraz ich frakcjami błonową i rybosomalną dodawano egzogennie antyoksydanty tj. kwas askorbinowy (AsA),  $\alpha$ -tokoferol i  $\beta$ -karoten. Czynniki te wywoływały, wbrew oczekiwaniom, wzrost ultrasłabej emisji fotonowej wskazując na prooksydacyjny charakter tych związków. Wyjątek stanowiła frakcja rybosomalna, dla której ujawnił się antyoksydacyjny charakter AsA.

Rośliny eksponowane na działanie lokalnych anestetyków, tj. prokainy i lignokainy, wykazały wzrost natężenia USL, który występował po okresie około dwóch godzin od podania biocynnika. Przy temperaturach 30 i 35°C pojawiał się oscylacyjny charakter zmian w USL. W czasie trwania opóźnionej luminescencji podany anestetyk powodował obniżanie intensywności

"świecenia", co świadczyłoby o antyoksydacyjnym charakterze jego oddziaływania lub udziale jego cząsteczek w procesie dodatkowego wygaszania opóźnionej luminescencji chloroplastów.

Wraz ze wzrostem temperatury środowiska roślin *Nitellopsis obtusa* od 0 do ok. 40°C następował także wzrost natężenia USL. Po osiągnięciu temperatury 40°C wystąpił spadek USL, a następnie silna „erupcja” promieniowania związana już najprawdopodobniej z procesami nekrotycznymi u roślin. Podczas cyklicznych zmian temperatury od 6 do 36°C, natężenie USL roślin zmieniało się w sposób powodujący powstawanie „pętli histerezy”. Przy trzecim cyklu zmian temperatury charakter pętli zanikał, co mogło świadczyć o zaadaptowaniu się badanych roślin do zmiennych warunków temperaturowych w otoczeniu.

Dzięki zastosowaniu metody SPCI możliwa była lokalizacja uszkodzeń mechanicznych w komórkach oraz uzyskanie informacji o różnorodności przestrzenno-czasowych odpowiedzi komórek na zadawane bodźce zewnętrzne.

W świetle powyższych badań ultrasłaba emisja fotonowa układów żywych może być pomocna w ocenie stanu homeostazy tych obiektów, a w powiązaniu z innymi metodami biochemicznymi i biofizycznymi może pozwolić na wyjaśnienie różnych procesów zachodzących w komórkach.



## Summary

The phenomenon of ultra-weak photon emission from living systems still attracts attention of people due to the versatility of its occurrence in nature and used measurement methods that are completely non-invasive to the tested object.

Spontaneous ultra-weak electromagnetic radiation (invisible to the naked eye) accompanies uninterruptedly to living matter and reflects the cell metabolic processes, which are connected with free-radical reactions. In an undisturbed state of the living object, stationary ultra-weak photon emission reflects the redox balance of the cell, while the changes in the intensity of the emission and the pace of those changes are correlated with the response of the cells to the stimulus given from surrounding.

The monograph discusses the measurement techniques of ultra-weak photon emission with Single Photon Counting (SPC) using a photomultiplier and luminescence imaging method with CCD matrix, obtaining space-time images out of biological objects (Single Photon Counting Imaging method – SPCI). Spectral distribution of ultra-weak luminescence (UWL) was obtained with the SPC method thanks to using cut-off filters.

Spontaneous ultra-weak photon emission out of Characeae algae (genus: *Nittellopsis obtusa*) is obtained after longer so-called delayed luminescence of chlorophyll (3.5–6h). These plants, known as model objects in electrophysiological researches, showed a correlation of ultra-weak electromagnetic radiation with the vegetation period. The radiation manifested its oscillating nature in 10 percent of the samples tested. Spectral distribution shows that the major emitters of the radiation are singlet oxygen dimols, carbonyl groups and chlorophyll that, in spite of maintaining the plants in darkness, glow by absorbing the energy of chemically excited molecules.

Some antioxidants, i.e. ascorbic acid (AsA),  $\alpha$ -tocopherol and  $\beta$ -carotene were added exogenously to the samples with plants and with their subcultures (isolated cytoplasm, cell walls and isolated chloroplasts) and also membrane and ribosomal fractions. The factors caused, contrary to expectations, the increase of ultra-weak photon emission showing pro-oxidative character of these compounds. The exception was ribosomal fraction in which antioxidant AsA character was revealed.

The plants exposed to local anaesthetics, i.e. procaine and lignocaine showed the increase of concentration of UWL that appeared in about 2 hours since the bioagent was given. In the temperatures of 30° i 35°C there appeared oscillatory nature of the changes of UWL. During the delayed luminescence, the given anaesthetic caused a reduction in intensity of glowing which reflects antioxidant capacity of its impact or the involvement of its molecules in the additional quenching the delayed luminescence of chloroplasts.

The increase of the temperature of the environment with *Nitellopsis obtusa* plants from 0° to about 40°C was followed by the increase in the intensity of UWL. After reaching the temperature of 40°C, there was UWL decrease, and then a strong "eruption" of radiation, probably connected with necrotic processes of the plant cells. During the cyclic temperature changes from 6° to 36°C, UWL intensity of the plants changed causing the formation of hysteresis loop. At the third series of temperature changes the formation of the loop disappeared, which could indicate the adaptation of the plants to variable temperature conditions in the environment.

Thanks to the use of SPCI method, it was possible to localize mechanical damages in cells, and obtaining the information about the diversity of space-time response of the cells to inflicted external stimuli.

In the light of the above findings ultra-weak photon emission of living systems may be helpful in assessing the state of homoeostasis of those objects, and in the connection with other biochemical and biophysical methods, it may allow to explain various processes in cells.

## Wykaz użytych skrótów

AL	– anestetyki lokalne,
APW	– artificial pond water – roztwór standardowy dla roślin,
AsA	– kwas askorbinowy – witamina C, antyoksydant hydrofilowy,
$E_A$	– energia aktywacji,
FMN	– mononukleotyd flawinowy – grupa prostetyczna wielu oksyreduktaz działających m. in. w łańcuchu oddechowym,
$h$	– stała Plancka,
$\Delta H$	– zmiana entalpii,
L	– reszta kwasów tłuszczowych,
NADH	– zredukowana postać dinukleotydu nikotynoamido-adeninowego – koenzymu wielu oksyreduktaz,
$Q_{10}$	– koenzym Q, zwany ubichinonem,
SPC	– Single Photon Counting,
SPCI	– Single Photon Counting Imaging,
TTL	– transistor-transistor logic – cyfrowy system transmisji danych,
USL	– ultrasłaba luminescencja,
UWL	– ultraweak luminescence,
$\nu$	– częstość fali,
$\lambda$	– długość fali.

## Wstęp

Świecenie organizmów żywych znane jest od tysiącleci. Obserwowano je u niektórych gatunków chrząszczy znanych jako robaczki świętojańskie [*Photinus*] oraz niektórych grzybów [*Mycena silvaelucens*], bakterii morskich [*Vibrio fisheri*, *Photobacterium* sp.], alg [*Noctiluca scintillans* z rodzaju *Dinoflagellatae*], meduz [*Aequorea victoria*] czy głębinowych organizmów morskich [jamochłony *Renilla*]. Zjawisko to, zwane dziś bioluminescencją, opisywał już Arystoteles w IV w. przed Chrystusem. Natężenie tego promieniowania jest na tyle intensywne, że można je obserwować gołym okiem. Jednak zjawisko to cechuje niewielką liczbę organizmów występujących w przyrodzie w przeciwieństwie, do tzw. ultrasłabego promieniowania fotonowego, które emitują wszystkie organizmy żywe. Emisja ta, w przeciwieństwie do bioluminescencji, jest niewidoczna gołym okiem gdyż liczba fotonów emitowanych w zakresie widzialnym leży poniżej bezwzględnego progu energetycznego czułości naszego oka. Dlatego też została zaobserwowana dopiero w ubiegłym stuleciu i jest jeszcze nie do końca poznana. Promieniowania tego nie odbieramy jako wrażenie świetlne, bo wynosi zaledwie  $10\text{--}10^3$  fotonów/( $\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$ ). Pierwsze doniesienia o ultrasłabym promieniowaniu w zakresie ultrafioletu pochodzą z 1923 roku, gdy radziecki badacz Gurwicz donosił o eksperymencie, w którym dzielące się komórki korzenia cebuli miały stymulować podziały (mitozę) w komórkach sąsiedniego korzenia cebuli za pośrednictwem emitowanego ultrasłabego promieniowania, nazwanego później mitogenetycznym.

W pierwszej połowie XX wieku nie istniały żadne czułe urządzenia, pozwalające na bezsporne stwierdzenie istnienia ultrasłabego świecenia. Pomimo tego, że badano różnorodny materiał biologiczny w różnych laboratoriach świata, to jednak nie wszystkim badaczom udawało się potwierdzić występowanie wspomnianego promieniowania. Dlatego też przekonanie o jego istnieniu miało tyłuż zwolenników, co przeciwników, zaś kwestia ta stanowiła temat wielu polemik naukowych (Hollaender i Klaus 1937; Quickenden i Que Hee 1981).

Definitywne potwierdzenie istnienia ultrasłabej emisji fotonowej nastąpiło ostatecznie w drugiej połowie XX wieku. „Widzenie” czyli rejestracja tego promieniowania wymagała użycia specjalnych technik pomiarowych. Po wynalezieniu fotopowielacza w latach pięćdziesiątych, nastąpił gwałtowny rozwój badań zjawiska ultrasłabej luminescencji (USL) z układów biologicznych – zarówno roślinnych, jak i nieco później – zwierzęcych. Nastąpiło to zwłaszcza po eksperymencie, w którym przypadkowo dwaj włoscy fizycy Colli i Facchini, stosując fotopowielacz, stwierdzili istnienie promieniowania w zakresie światła widzialnego etiolowanych sadzonek różnych roślin (Colli i wsp. 1955).

Lata 60-te to okres, w którym badania ultrasłabej luminescencji prowadziły głównie grupy uczonych radzieckich. Stosowane wówczas fotopowielacze charakteryzowały się dużymi szumami własnymi, co wymagało schładzania ich

do temperatury ciekłego azotu. Pomiary przeprowadzano w zakresie światła widzialnego (Vladimirov 1966, Tarusov i wsp. 1967, Zhuravlev i wsp. 1968), jak również w ultrafiolecie (Konev 1967, Konev i wsp. 1966). W miarę postępu techniki stosowano coraz czulsze fotopowielacze, nie wymagające już tak niskich temperatur chłodzenia oraz zminiaturyzowane fotopowielacze pozwalające na tworzenie dwuwymiarowych obrazów badanych emiterów ultrasłabej luminescencji – tzw. „microchannel plate” (MCP) – (Weidemann i wsp. 1990, Kobayashi i wsp. 1996). Zastosowanie detektorów półprzewodnikowych (fotodiod) umożliwiło rozszerzenie badanego spektrum USL w stronę fal długich (Isoshima i wsp. 1995, Makiuchi i wsp. 1997). Techniki obrazowania oparte na półprzewodnictwie to: PCD – „plasma coupled device” (wielokanałowe powielacze elektronowe zawierające diody krzemowe) (Kasperkovitz 1975) oraz CCD – „charge coupled device” (pojedyncze przetworniki ze sprzężeniem ładunkowym ułożone w matryce) (Kobayashi i wsp. 1997, Górski i Sławiński 2002). Wysoką czułość obrazowania można uzyskać, stosując połączenie technik MCP i CCD. Technika ta zwana jest ICCD (Intensified charge coupled device) (Chen i wsp. 2003, Kobayashi 2014).

Dynamicznie rozwijająca się technologia i technika elektroniczna oraz inżynieria nowych materiałów powodują, że metody badawcze słabych luminescencji ulegają i będą ulegać dalszemu doskonaleniu (Inaba 1997, Prasad i wsp. 1999, Swain 2003, Tudisco i wsp. 2003, Mazin i wsp. 2013, Reiserer i wsp. 2013). Bezspornym atutem badania ultrasłabej emisji fotonowej z układów żywych jest całkowita nieinwazyjność metody badawczej. Detekcja emitowanego promieniowania odbywa się poza obrębem obiektu badanego, ale w możliwie bliskiej odległości od niego.

Bioluminescencja jako zjawisko dobrze zbadane co do mechanizmu świecenia, doczekała się praktycznych zastosowań po wyizolowaniu białka z meduzy *Aequorea victoria*, a następnie genu z tego białka odpowiedzialnego za świecenie tzw. zieloną fluorescencją (Green Fluorescence Protein-GFP). Za te osiągnięcia Osamu Shimomura, Martin Chalfie i Roger Y. Tsien otrzymali nagrodę Nobla w 2008 roku w dziedzinie chemii. Dzięki wyizolowaniu „świecącego” genu możliwe było utworzenie białek zmodyfikowanych, które wbudowane mają białko GFP jako fragment. Tak zmodyfikowane białka fluoryzują w zakresie promieniowania widzialnego, co czyni możliwym obrazowanie układów żywych *in vivo* i pozwala śledzić np. rozwój embrionów i komórek nerwowych w mózgu oraz obserwować przerzuty komórek nowotworowych. Wykorzystuje się to także do obserwacji procesów tworzenia się komórek podczas regeneracji narządów oraz tworzenia się tkanek z pojedynczych komórek.

Ultrasłaba emisja fotonowa nie jest jeszcze, jak wspomniano, tak dobrze poznana jak bioluminescencja. Wiadomo, że występuje w całkowitej ciemności i nie wymaga zewnętrznego pobudzenia. Jest skojarzona w materiale żywym z istnieniem organicznych komponentów, z odniesieniem ich do procesów i fun-

kcji życiowych oraz aktywności biologicznej organizmów. Została odkryta w mikroskopowych jak i makroskopowych układach: w układach lipidowych (Tilbury i Miller 1999, Birtic i wsp. 2011), w bakteriach (Tilbury i Quickenden 1988, Trushin 2004, Laager i wsp. 2009), w namnażających się drożdżach (Quickenden i Que Hee 1974, Godlewski i wsp. 1993, Nerudova i wsp. 2015), w leukocytach (Van Wijk i wsp. 2011), w komórkach nerwowych (Zhang i wsp. 1997, Sun i wsp. 2010), Salari i wsp. 2015), mitochondriach i chloroplastach (Hideg i wsp. 1991a, Hideg i wsp. 1990), ale i w komórkach nowotworowych (Takeda i wsp. 2004, Karbowski i wsp. 2015), w tkance wątrobowej (Devaraj i wsp. 1991, Kim i wsp. 2003), nerkowej (Zhang i wsp. 1992), w powietrzu wydychanym przez człowieka (Deby-Dupont i wsp. 1998), w płynach ustrojowych (Kobayashi i wsp. 2001). Była i jest intensywnie badana w organizmach roślinnych (Usa i wsp. 1990, Schauf i wsp. 1992, Kai i wsp. 1993, Roschger i wsp. 1993, Abeles 1986, Lavorel 1980, Radotić i wsp. 1998, Jaśkowska i wsp. 2001a, 2001b, Milczarek i wsp. 2003, Komatsu i wsp. 2014) w tym etiolowanych (Colli i Facchini 1954, Colli i wsp. 1955, Sławińska i wsp. 1992), w kiełkujących nasionach (Kobayashi i wsp. 1997, Usa i wsp. 1989, Grasso i wsp. 1991, Gallep 2014) oraz ze zwierząt: mysz (He i wsp. 1999, rozwielitki *Daphnia magna* (Galle i wsp. 1991). Badano również ultrasłabą emisję fotonową *in vivo* z ciała człowieka (Van Wijk E. i Van Wijk R. 2005, Rastogi i Pospíšil 2011, Yang i wsp. 2015). Ostatnie badania wskazują, że ultrasłaba emisja fotonowa wydaje się być dobrą metodą do analizowania oddziaływania nanocząstek z różnymi obiektami biologicznymi (Hossu i wsp. 2010, Hossu i wsp. 2013).

Ultrasłaba emisja fotonowa może być przez swą uniwersalność występowania w układach żywych bardzo przydatna i czeka na nowe jej wykorzystanie dla potrzeb człowieka. Jednak ze względu na mnogość emiterów tej emisji oraz złożoność procesów życiowych, jej interpretacja może nastroić wciąż niemałe trudności, tym niemniej warto poznać dogłębniej jej możliwości i ograniczenia.

*Autorzy pragną wyrazić podziękowanie osobom, których wiedza i wyposażenie pracowni naukowych umożliwiły poszerzenie prowadzonych przez nas badań.*

*Prof. dr hab. Januszowi Sławińskiemu dziękujemy za inspiracje badań, owocne dyskusje oraz umożliwienie skorzystania z aparatury Molecular Light Imager.*

*Dr Zbigniewowi Górskiemu dziękujemy za pomoc w uzyskaniu obrazów luminescencyjnych glonów.*

*Dr Irenie Milczarek dziękujemy za wieloletnią współpracę w zakresie badań luminescencyjnych, a w szczególności analiz spektralnych.*

*Prof. dr hab. Wiesławowi I. Gruszeckiemu dziękujemy za umożliwienie uzyskania preparatów  $\beta$ -karotenu, oraz cenne wskazówki.*

*Mgr Januszowi Matusiewiczowi dziękujemy za wykonanie elektronogramów frakcji subkomórkowych z wykorzystaniem mikroskopu elektronowego.*

*Dr Grzegorzowi Nowakowi dziękujemy za pomoc w uzyskaniu frakcji substrukturalnych komórek glonów Characeae.*

## 1. Zjawiska emisji fotonowej

Emisja fotonowa w zakresie widzialnym (luminescencja) jest zjawiskiem zachodzącym w materii podczas różnych procesów związanych z wydzielaniem energii np. chemicznej czy też elektrycznej. Energia ta umożliwia wzbudzenie elektronowe atomów lub cząsteczek, które w wyniku deekscytacji generują fotony o energiach  $E$  związanych z długością fali  $\lambda$  następującym związkiem:

$$E = \frac{h \cdot c}{\lambda},$$

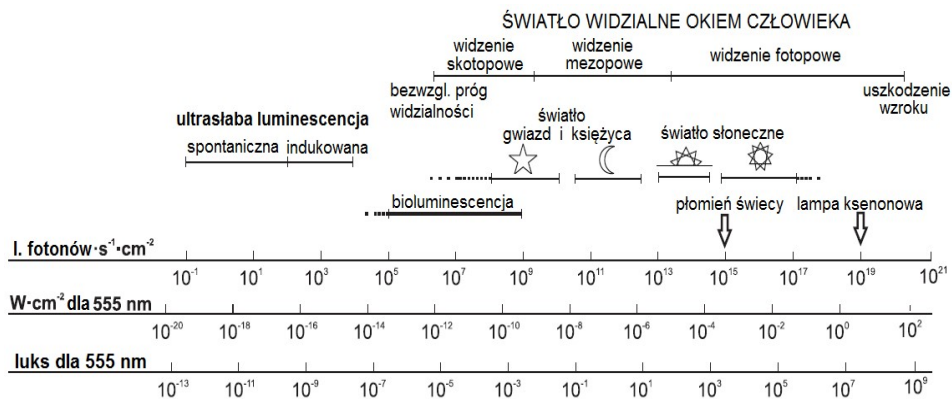
gdzie  $h$  to stała Plancka, a  $c$  jest prędkością światła w próżni.

Luminescencja nie jest zatem promieniowaniem odbitym czy też rozproszonym, najczęściej obserwowanym przez oko człowieka. Dla opisywanego zjawiska przyjmuje się, że  $\lambda$  mieści się w zakresie fal elektromagnetycznych obejmującego zakres ultrafioletu, światła widzialnego i bliskiej podczerwieni. Zjawisko luminescencji można obserwować w gazach, cieczach, ciałach stałych, ale również – w żywej materii. Emisja fali elektromagnetycznej w rozpatrywanym zakresie długości fali promieniowania temperaturowego z materii żywej w temperaturach fizjologicznych (0–40°C) zgodnie z wzorem Plancka dla ciała doskonale czarnego jest bardzo mała i z tego też powodu nie jest brana pod uwagę w pomiarach ultrasłabej luminescencji (USL) (Cifra i Pospíšil 2014).

Luminescencję powstałą w wyniku reakcji chemicznej nazywamy chemiluminescencją, natomiast chemiluminescencję organizmów żywych, która następuje kosztem energii metabolicznej nazywa się biochemiluminescencją. Taka emisja fotonowa nie indukowana czynnikami zewnętrznymi (np. światłem) nazywa się luminescencją spontaniczną. Luminescencja spontaniczna dzieli się na bioluminescencję i ultrasłabą biochemiluminescencję (dla której używana jest też nazwa ultrasłaba luminescencja lub ultrasłaba emisja fotonowa). Bioluminescencja jest świeceniem organizmów dostrzegalnym przez ludzkie oko zwłaszcza w ciemności. Taka forma świecenia jest jednak zjawiskiem dość rzadkim.

Ultrasłaba biochemiluminescencja ma charakter powszechny i jest generowana z całych organizmów biologicznych (roślin, zwierząt i ludzi), jak również ich narządów, tkanek i frakcji komórkowych. To ultrasłabe „uniwersalne świecenie” jest około milion razy słabsze od bioluminescencji (Popp 1984) i oko ludzkie nie jest w stanie go zarejestrować. Przyjmuje się, że obserwowalną ultrasłabą luminescencję (USL) stanowi promieniowanie elektromagnetyczne o intensywności od 1 do 10 000 fotonów z 1 cm<sup>2</sup> powierzchni w ciągu 1 sekundy. Odpowiada to natężeniu od około 10<sup>-20</sup> do 10<sup>-15</sup> watów na 1 cm<sup>2</sup> dla fali o długości 555 nm i natężeniu oświetlenia do 10<sup>-8</sup> luksa (rys.1.1). Zaadaptowane do ciemności oko ludzkie zdolne jest zobaczyć światło o natężeniu oświetlenia 10<sup>-5</sup> luksa. Zatem intensywność ultrasłabego świecenia leży daleko poniżej progu energetycznego ludzkiego oka. Zakres spektralny tego promieniowania obejmuje obszar od

ultrafioletu do bliskiej podczerwieni (200–1000 nm) i ograniczony jest tylko możliwością obserwacji, zwłaszcza w obszarze fal długich (Ma i wsp. 2002).



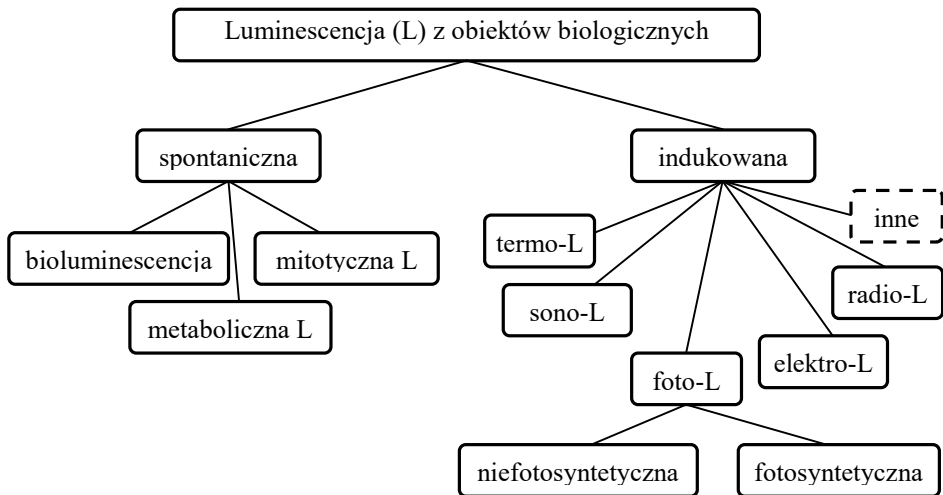
Rys.1.1. Jednostki energetyczne promieniowania świetlnego porównujące ultrafioletową emisję fotonową z innymi zjawiskami świetlnymi. Pierwsza oś od góry jest wielkością radiometryczną oznaczającą liczbę fotonów emitowanych w przeciągu jednej sekundy z jednego cm<sup>2</sup> powierzchni. Druga oś także reprezentuje wielkość radiometryczną oznaczającą natężenie promieniowania (irradiancję) określoną jako strumień promieniowania w watach na jednostkę powierzchni. W przedstawionym przypadku jest to powierzchnia 1 cm<sup>2</sup>, na którą pada cała liczba fotonów z zakresu promieniowania świetlnego a każdemu fotonowi przypisana jest energia odpowiadająca długości fali 555 nm. Trzecia oś opisuje wielkość fotometryczną nazwaną natężeniem oświetlenia będącą gęstością strumienia świetlnego padającego na jednostkę powierzchni mierzoną w luksach (lx). Zastosowano tutaj przybliżenie, że wszystkie przychodzące fotony odpowiadałyby długości 555 nm. (Cifra i Pospíšil 2014 – schemat zmodyfikowany)

Ze względu na sposób wzbudzenia emisji fotonowych z układów biologicznych, można je podzielić w sposób przedstawiony schematycznie na rysunku 1.2. Nie każdy rodzaj luminescencji przedstawiony na rysunku jawi się jako ultrafiolet – wyjątek stanowią bioluminescencja i niektóre indukowane zmiany ultrafioletowej luminescencji w trakcie trwania bodźca lub też bezpośrednio po nim.

Najbardziej znanym rodzajem emisji fotonowej z obiektów biologicznych jest bioluminescencja. Zjawisko bioluminescencji występuje u niektórych gatunków owadów (robaczki świętojańskie), grzybów, bakterii, pierwotniaków, glonów (bruzdnice), jamochłonów morskich, mięczaków, skorupiaków i ryb głębinowych. Ich świecenie jest efektem enzymatycznego utleniania lucyferyn w obecności enzymów zwanych lucyferazami (Steinberg i wsp. 1995). Lucyferaza powoduje reakcję tlenu cząsteczkowego z długołańcuchowymi aldehydami co powoduje, w wyniku peroksydacji lipidów, utworzenie grupy karboksylowej. W utlenianiu aktywna jest dehydrogenaza:  $\text{NADH} + \text{aldehyd} + \text{tlen}$ . Reakcja ta w obecności lucyferyny i lucyferazy produkuje kwas karbonylowy, wodę i światło. Reakcje takie mają dużą wydajność kwantową, np. bioluminescencja



chrząszcza *Photinus Pylaris* ma maksimum natężenia świecenia dla długości fali 562 nm przy wydajności kwantowej równej 0,88 co oznacza, że 88 kwantów jest emitowanych przez 100 cząsteczek lucyferyny. Luminescencja może również towarzyszyć utlenianiu lucyferyny bez obecności katalizatora, jednakże w obecności cząsteczki ATP (Vassilev 1967). Wydajność kwantowa jest wówczas o wiele mniejsza, a emitowane światło mniej intensywne.



Rys.1.2. Rodzaje emisji fotonowych (luminescencji) obiektów biologicznych

Bioluminescencja organizmów ma czasami spektakularny charakter. Przykładem może być synchroniczne rytmiczne świecenie niektórych gatunków świetlików (Strogatz i Stewart 1993) lub bioluminescencja organizmów morskich opisywana przez wielu żeglarzy zwana powszechnie "mlecznym morzem" (Haddock i wsp. 2010). Istnieją także pewne gatunki fitoplanktonu należące do gromady bruzdnic, które wysyłają promieniowanie świetlne w sytuacji ruchów wody morskiej (Marcinko i wsp. 2013) objawiające się jako świecące fale lub świecące smugi wokół poruszających się po wodzie obiektów.

Następnym rodzajem promieniowania, któremu warto poświęcić nieco uwagi jest promieniowanie mitotyczne (mitogenetyczne) powstające w wyniku podziałów komórkowych (mitozy) (Volodyaev i Belousov 2015). To ultrasłabe promieniowanie jako pierwszy wykrył i postulował jego istnienie rosyjski uczoney A. Gurwicz (Gurvitsch i wsp.1923). W latach 20. XX wieku twierdził on, że dzielące się komórki emitują promieniowanie ultrafioletowe, pobudzając do podziału inne komórki. Oszacował, że długość fali tego promieniowania wynosi około 260 nm. Pierwszy eksperyment Gurwicza wykonany w 1923 r. pozwalał stwierdzić, że końcówka korzenia cebuli pobudzała do wzrostu korzeń

sąsiedniej cebuli. Lecz dostępne wówczas techniki pomiarowe nie pozwoliły na bezsporne potwierdzenie istnienia promieniowania mitotycznego. Najczulszymi stosowanymi wówczas detektorami były liczniki gazowe, np. Geigera-Millera (Rodionow i Frank 1934, Siebert i Seffert 1934) oraz preparaty biologiczne z dzielącymi się komórkami, np. drożdży (Rylska 1948). Jednak nie wszystkim badaczom udawało się zaobserwować to promieniowanie pomimo badania różnorodnego materiału biologicznego.

Zjawisko emisji promieniowania elektromagnetycznego przez organizmy żywe w wyniku podziału ich komórek, zostało bezspornie potwierdzone dopiero w 1974 roku przy użyciu wynalezionej wcześniej fotopowielacza (Quickenden i Que Hee 1974). Ci sami badacze dwa lata później analizując rozkład spektralny promieniowania dzielących się drożdży wykazali istnienie tego promieniowania nie tylko w zakresie UV lecz także w obszarze widzialnym fal elektromagnetycznych. (Quickenden i Que Hee 1976). Stwierdzono później, że promieniowanie to jest najbardziej intensywne tuż przed rozpoczęciem mitozy (Scot i wsp. 1989). Pochodzenie promieniowania z dzielących się komórek oraz jego znaczenie w biologii komórki nie jest ostatecznie wyjaśnione, tym niemniej badanie tego promieniowania wydaje się istotne z punktu widzenia fotonowej komunikacji komórkowej (Cifra i wsp. 2011).

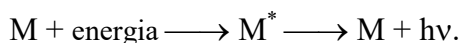
Luminescencję indukowaną światłem dzieli się na fotosyntetyczną i niefotosyntetyczną (rys.1.2). Ta pierwsza pozwala na badanie aparatu fotosyntetycznego w organizmach zawierających chlorofil (Goltsev i wsp. 2009). Luminescencję fotosyntetyczną występującą w czasie do około 1 minuty po przerwaniu naświetlania nazywa się opóźnioną fluorescencją. Pomiar jej rozkładu spektralnego pozwoliły stwierdzić, że maksima emisji dla chloroplastów występują dla 685 nm oraz o wiele mniej intensywne dla 730 nm (Hideg i wsp. 1991, Zeng i wsp. 2007). Luminescencję występującą następnie przez kilkadziesiąt minut po naświetleniu zwykło się nazywać opóźnioną emisją świetlną. Powyżej tego czasu mamy do czynienia z ultrasłabą emisją światła (Hideg i wsp. 1992).

Luminescencję można indukować poprzez: mechaniczne zrywanie materiałów (mechanoluminescencja lub triboluminescencja) np. naturalnych włókien lub włosów (Li i Haneman 1999), ultradźwiękowe oddziaływanie na badany materiał (sonoluminescencja), np. na tkankę nowotworową (Kim i wsp. 2008), oddziaływanie falami elektromagnetycznymi (radioluminescencja), np. przez emisję promieniowania gamma na kwasy humusowe (Gończko i Sławiński 2004). Luminescencja indukowana polem lub prądem elektrycznym nosi nazwę elektroluminescencji (Hung i Chen 2002), a jej szczególnym przypadkiem jest elektrycznie generowana chemiluminescencja zwana elektrochemiluminescencją (Miao 2008). Emisja światła z naświetlonej uprzednio próbki podczas zmian temperatury to termoluminescencja (Ducruet J. i Vass 2009).

Przedstawiony powyżej sposób klasyfikacji i podziału luminescencji z obiektów biologicznych jest dość umowny i możliwa jest jego modyfikacja i rozszerzenie.

## 2. Źródła ultrasłabej emisji fotonowej z układów żywych

Molekuły (M), które emitują fale elektromagnetyczne o długości 1000–200 nm muszą pochłonąć dość znaczną porcję energii, t.j. odpowiednio: 120–600 kJ/mol. Schematycznie można to zapisać:

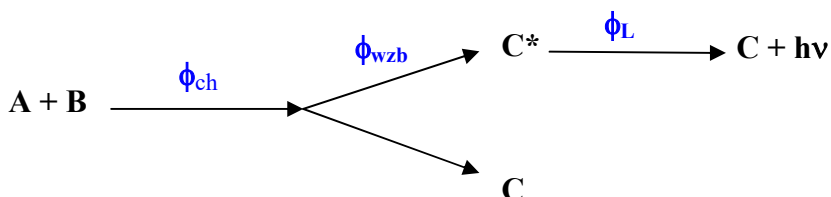


Energia  $\Delta E$  wzbudzająca cząsteczkę, czerpana jest z układu biologicznego w procesach egzoenergetycznych. Z termodynamicznego punktu widzenia można zapisać:

$$\Delta E < \Delta H + \Delta H^+,$$

gdzie  $\Delta H$  jest entalpią reakcji chemicznej, natomiast  $\Delta H^+$  jest energią aktywacji.

Intensywność świecenia obiektu zależy od kwantowych wydajności procesów, które muszą w nim zajść na drodze: od reakcji chemicznej substratów do emisji kwantów przez produkty. Drogę owych procesów przedstawia schemat:



$$\phi = \phi_{ch} \cdot \phi_{wzb} \cdot \phi_L,$$

gdzie:

$\phi_{ch}$ – chemiczna wydajność tworzenia produktu,	$\phi_{ch} = N_{C+C^*} / N_{A+B}$
$\phi_{wzb}$ – kwantowa wydajność wzbudzenia,	$\phi_{wzb} = N_{C^*} / N_{C+C^*}$
$\phi_L$ – kwantowa wydajność luminescencji,	$\phi_L = N_{h\nu} / N_{C^*}$
$\phi$ – ogólna wydajność kwantowa,	$\phi = N_{h\nu} / N_{A+B}$

$N_{C+C^*}$  – liczba produktów,

$N_{A+B}$  – liczba substratów,

$N_{C^*}$  – liczba produktów w stanie wzbudzonym,

$N_{h\nu}$  – liczba emitowanych fotonów.

Z wielu oszacowań wynika, że wydajność kwantowa bioluminescencji jest bliska jedności. Wydajność kwantową procesów odpowiedzialnych za ultrasłabe świecenie organizmów ocenia się natomiast na:  $10^{-14}$ – $10^{-10}$ . Znając ogólną wydajność kwantową  $\phi$  i mierząc natężenie świecenia, można wyznaczyć absolutną szybkość reakcji oraz stężenie substancji emitujących promieniowanie elektromagnetyczne.

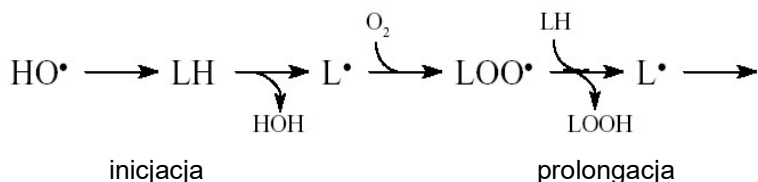
Podsumowując – ażeby wystąpiła chemiluminescencja, czyli przekształcanie energii chemicznej w kwant energii elektromagnetycznej, w rozważanych przedziałach długości fal (200–1000 nm), muszą być spełnione następujące warunki:

- 1) musi być wydzielona dostatecznie duża porcja energii  $\Delta H + \Delta H^{\ddagger}$ ,
- 2) w reakcji wzbudzenia musi uczestniczyć molekula posiadająca odpowiednie pasma energii dozwolonych umożliwiające pożądane wzbudzenia,
- 3) muszą wystąpić odpowiednio duże wydajności kwantowe:  $\phi_{wzb}$  i  $\phi_L$ .

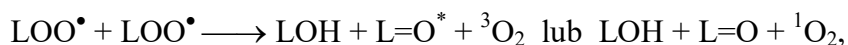
Dla przykładu, warunku pierwszego nie spełnia podstawowa reakcja bioenergetyczna, bezpośrednio dostarczająca komórce energii, to jest enzymatycznie kontrolowana hydroliza adenylotrifosforanu (ATP) do adenylodifosforanu (ADP). Energia swobodna tej reakcji jest zbyt mała (ok. 50 kJ/mol), aby hydroliza ATP mogła być źródłem USL.

Wymienione warunki występowania chemiluminescencji są jednak spełnione w wielu innych reakcjach i procesach. Przede wszystkim przypisuje się je: przejściom tlenu singletowego  $^1\Sigma_g$  i  $^1\Delta_g$  oraz jego dimoli  $2(^1\Sigma_g)$ ,  $2(^1\Delta_g)$  i  $(^1\Sigma_g \ ^1\Delta_g)$  do stanu podstawowego trypletowego  $^3\Sigma_g$  (patrz tabela 2.1). Po drugie – mogą stanowić wynik deekscytacji związków karbonylowych (ketonów)  $^{1,3}(=C=O)^*$ , będących w stanie trypletowym lub (rzadko) singletowym wzbudzonym.

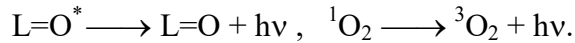
Głównymi reakcjami, którym towarzyszy generowanie tlenu singletowego i związków karbonylowych – po części wzbudzonych, zachodzącymi w organizmach biologicznych jest nieenzymatyczne i enzymatyczne utlenianie nienasyconych kwasów tłuszczowych, będących głównym składnikiem błon komórkowych (peroksydacja lipidów) (Sugioka i Nakano 1976, Cadenas 1989, Prasad i Pospíšil 2011, Miyamoto i wsp. 2014). Uproszczony schemat reakcji peroksydacji można przedstawić następująco:



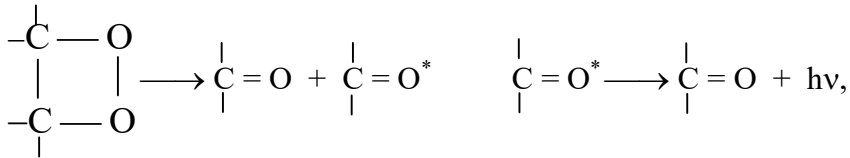
terminacja:



chemiluminescencja:



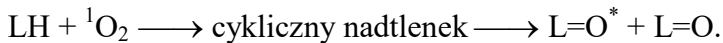
Do wytworzenia wzbudzonych ketonów, może dojść także w wyniku rozpadu cyklicznych nadtlenuków (dwooksyetanów):



W przypadku peroksydacji lipidów reakcja ta może być zapisana:



Do powstania cyklicznego nadtlenuku może także dojść w wyniku przyłączenia cząsteczki tlenu singletowego do podwójnego wiązania nienasyconego kwasu tłuszczowego:



W komórkach roślinnych tlen singletowy może powstawać nie tylko w reakcjach peroksydacji lipidów, lecz również może być wytwarzany w wyniku rozkładu  $H_2O_2$ , katalizowanego przez enzymy hemowe oraz peroksydazy (Lehninger 1970). Cząsteczka  ${}^1O_2$  może również powstawać w reakcjach utleniania polifenoli i aldehydów (Sławińska 1978, Watanabe i wsp. 1991).

Tabela 2.1. Przejścia w cząsteczce  $O_2$  z poziomów singletowych na poziomy trypletowe i odpowiadająca im długość fali –  $\lambda$  oraz energia – E. Indeks  $v=1$  oznacza pierwszy poziom wibracyjny

Rodzaj przejścia	$\lambda$ [nm]	E [kJ/mol]
$2O_2({}^1\Sigma_g^+) \rightarrow 2O_2({}^3\Sigma_g^-)$	382	313,4
$O_2({}^1\Sigma_g^+)({}^1\Delta_g) \rightarrow 2O_2({}^3\Sigma_g^-)$	478	250,5
$2O_2({}^1\Delta_g)_{v=1} \rightarrow 2O_2({}^3\Sigma_g^-)$	580	206,4
$2O_2({}^1\Delta_g) \rightarrow 2O_2({}^3\Sigma_g^-)$	634	188,9
$2O_2({}^1\Delta_g) \rightarrow 2O_2({}^3\Sigma_g^-)_{v=1}$	703	170,3
$O_2({}^1\Sigma_g^+) \rightarrow O_2({}^3\Sigma_g^-)$	762	157,1
$O_2({}^1\Sigma_g^+) \rightarrow O_2({}^3\Sigma_g^-)_{v=1}$	865	138,4

Ketony oraz tlen singletowy powstają także w reakcjach rekombinacji rodników (patrz terminacja w procesie peroksydacji lipidów). Szczególnym przypadkiem procesów wolnorodnikowych, prowadzących do chemiluminescencji, są reakcje indukowane chemicznie wymianą elektronu (CIEEL – „chemically initiated electron exchange luminescence”) (Schuster i Horn 1982). Chemiluminescencja towarzysząca reakcjom rodnikowym została szeroko opisana w pracach: Cadenas 1989, Cilento i Adam 1995, Voeikov 2001, Vladimirov i Proskurnina 2009.

Zarówno tlen jak i ketony uczestniczą w wielu reakcjach katabolicznych, np. w łańcuchu oddechowym. Dlatego też trudno jest w badaniach USL, prowadzonych *in vivo*, odpowiedzieć na pytanie w jakiej części komórki dochodzi do wytwarzania wyżej wymienionych produktów.

Źródłem chemiluminescencji mogą być także reakcje związane z przeniesieniem elektronu z donora D na akceptor A:



Produkty donora w stanie wzbudzonym  ${}^3D^*$  i  ${}^1D^*$  są odpowiednio źródłem fosforescencji i fluorescencji. Wzbudzenia te zachodzą bez udziału tlenu (Marcus i Sutin 1985, Cilento i Adam 1995). Ponadto źródłem USL mogą być zmiany konformacyjne dużych cząsteczek, np. DNA (Popp i wsp. 1984 b) oraz hydratacja wielu biocząsteczek, związana np. z pęcznieniem okrywy nasiennej lub błony przetrwalnika (Tryka 2006, Liang i wsp. 2013).

Istotnymi związkami chemicznymi, mającymi wpływ na chemiluminescencję, są tzw. sensybilizatory lub inaczej – fotouczulacze. Proces sensybilizacji polega na tym, że produkt w stanie wzbudzonym, ulegający deekscytacji bezpromienistej, może przekazać energię wzbudzenia cząsteczce (sensybilizatorowi), która w wyniku dostarczenia jej energii ulegnie deekscytacji promienistej. Zjawisko to dodatkowo zwiększa kwantową wydajność luminescencji ( $\phi_L$ ). W ultrasłabej luminescencji roślin rolę akceptorów energii spełniają m. in.: chlorofil, flawiny, pochodne indolu.

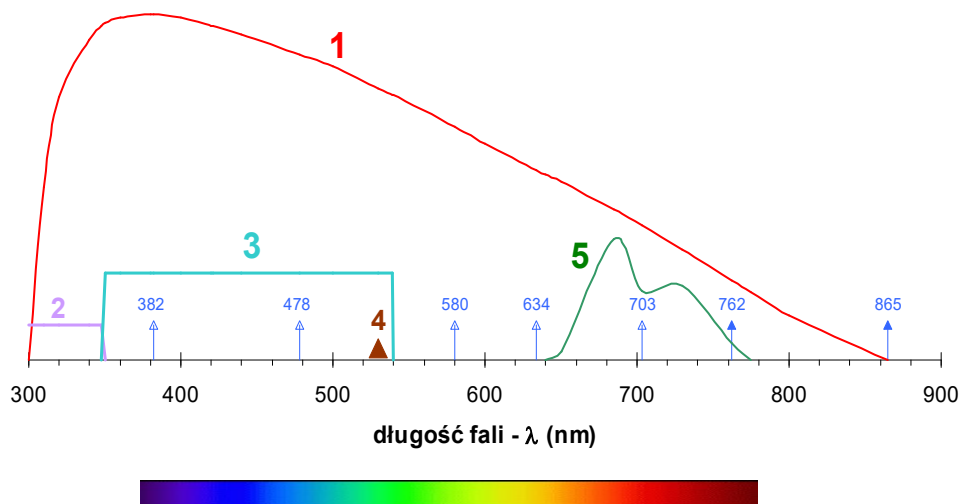
Chemiluminescencja sensybilizowana lucyferazą występuje w wielu przypadkach bioluminescencji (Steinberg i wsp. 1995). Zjawisko to wykorzystywane jest przez badaczy do „chemicznego wzmocnienia” USL poprzez zadanie świecącemu obiektowi badanemu – sensybilizatorów posiadających dużą wartość  $\phi_L$ , takich jak luminol czy lucygenina (Kalbhen 1980).

Ciekawą koncepcję, opartą na transferze energii wzbudzonych cząsteczek, zaproponował Cilento. Polega ona na tym, że wzbudzone cząsteczki mogą przekazywać swoją energię na inne cząsteczki, uczestniczące w wielu istotnych procesach życiowych komórki, wywołując w nich procesy fotochemiczne. Teoria ta nosi nazwę „fotochemii bez światła” (Cilento 1988).

Zjawiskiem odwrotnym do sensybilizacji jest bezpromieniste wygaszanie cząstek wzbudzonych. Takim efektywnym – powszechnie występującym

„wygaszaczem” wzbudzonej energii są cząsteczki wody, stanowiące typowe środowisko komórkowe.

Podstawowe emitery USL z frakcji komórek oraz całych organizmów roślinnych, wraz z odpowiadającymi im długościami emitowanych fal elektromagnetycznych z zakresu 300–900 nm, przedstawiono schematycznie na rysunku. 2.1. W tle widoczna jest krzywa czułości spektralnej (1) stosowanych fotopowielaczy.



Rys. 2.1. Ważniejsze emitery USL roślin, umiejscowione na osi obrazującej długości fal elektromagnetycznych na tle krzywej czułości spektralnej (1) stosowanych fotopowielaczy (THORN EMI 9558 z fotokatodą S-20). Pod wykresem zaznaczono obszar światła widzialnego. Dalsze oznaczenia: (2) – część zakresu spektralnego promieniowania mitotycznego (190–350 nm) (wg Quickenden i Que Hee 1974); (3) – zakres emisji grup karbonylowych (350–540 nm) (wg: Cadenas 1984, Federova i wsp. 2007); (4) – fluorescencja FMN w roztworze wodnym (wg Nishimura i Tsuboi 1978); (5) – opóźniona fluorescencja z chloroplastów (maks. dla 685 i 730 nm) (wg Hideg i wsp. 1989). Niebieskie strzałki oznaczają emisję tlenu singletowego (strzałki pełne dla 762 i 865 nm) oraz jego dimoli (strzałki puste) przy przejściu do stanu trypletowego (patrz tabela 2.1)

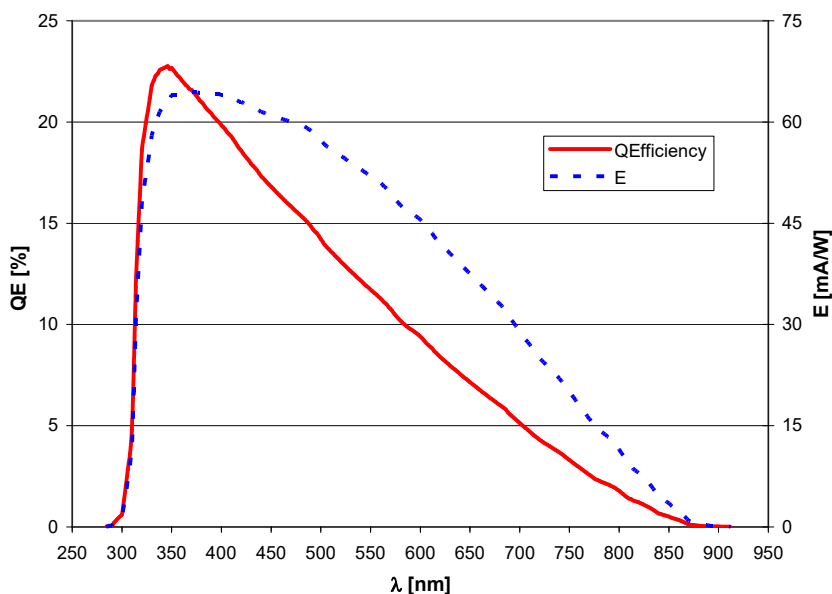
Literatura przeglądowa na temat ultrasłabej luminescencji obiektów biologicznych (w tym także i roślin) jest już dość obszerna, warto jednak zwrócić uwagę na następujące pozycje: Abeles 1986, Sławiński 1989, Radotić i wsp. 1998, Integrative biophysics 2003; Nissen 2006, Ives i wsp. 2014, Cifra i Pospíšil 2014, Ráfii-Tabar i Rafieiolhosseini 2015.

### 3. Stosowane metody i techniki pomiarowe

#### 3.1. Metoda zliczania pojedynczych fotonów

Do detekcji i rejestracji ultrasłabej emisji fotonowej stosuje się metodę zliczania pojedynczych fotonów (Single Photon Counting – SPC) z wykorzystaniem ultraczułych fotopowielaczy. Zakres spektralnej czułości tych urządzeń można modyfikować poprzez odpowiedni skład materiału fotokatody, zaś szumy i prąd ciemny obniżyć poprzez ich chłodzenie.

Pomiary ultrasłabego świecenia badanych obiektów dokonywano na dwóch stanowiskach pomiarowych wykonanych we własnym zakresie z zastosowaniem kasyety CAMAC firmy Polon. Jako detektory fotonów użyte były dwa wyselekcjonowane fotopowielacze – odpowiednio czułe i posiadające niski poziom szumów własnych (Zherebin i Sava 1980). Stanowiska pomiarowe wyposażone były w fotopowielacze THORN EMI 9558A z wielokatalityczną fotokatodą S-20 (Na - K - Cs - Sb) o podwyższonej czułości w zakresie długofalowym widma oraz o średnicy powierzchni efektywnej 45 mm. Czułość spektralna użytych fotopowielaczy (przedstawiona na rys. 3.1) umożliwia pomiar światła z zakresu widzialnego z niewielkimi przedziałami przypadającymi na część ultrafioletową i podczerwoną widma. Warunki pracy stosowanych fotopowielaczy oraz niektóre ich dane katalogowe przedstawiono w tabeli 3.1.



Rys. 3.1. Wydajność kwantowa (QE) oraz czułość (E) fotokatody S-20 (na podstawie danych katalogowych producenta)



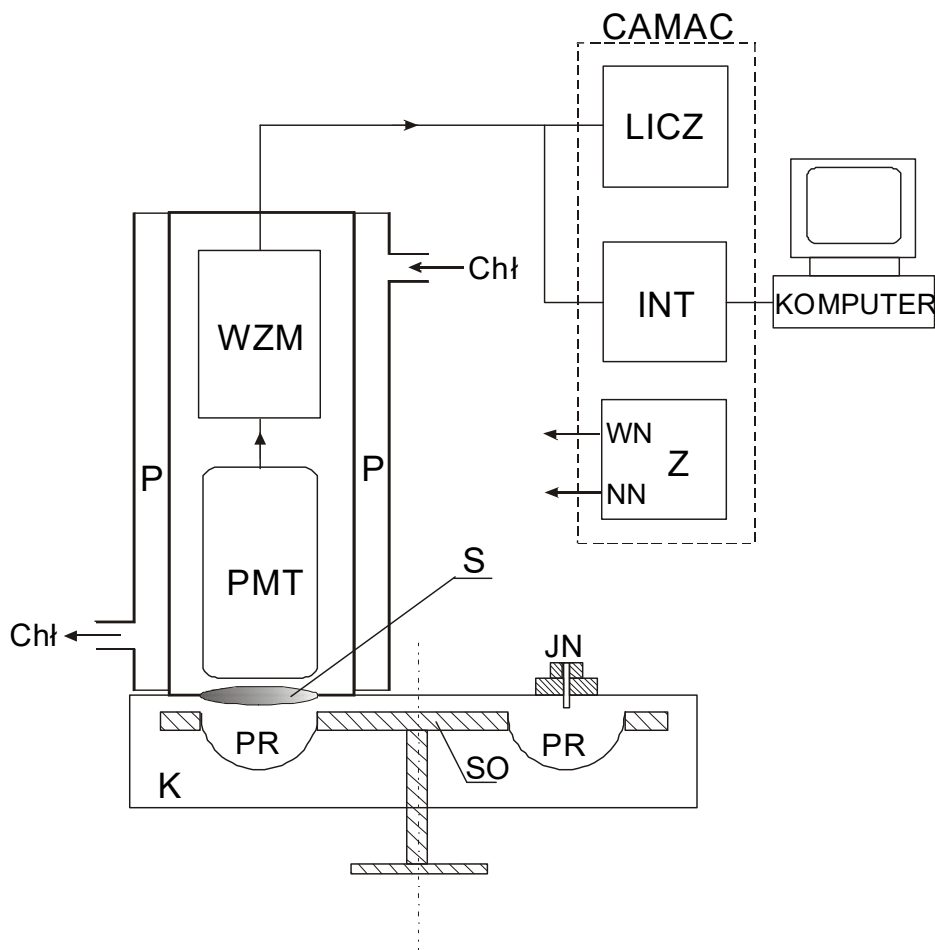
Tabela 3.1. Warunki pracy oraz dane katalogowe fotopowielaczy użytych do badania USL

<b>Fotopowielacze EMI 9558A</b>	<b>Stan. pomiar. nr 1 (rys. 3.2)</b>	<b>Stan. pomiar. nr 2 (rys. 3.3)</b>
Napięcie pracy ( $U_{K-A}$ )	1300 V	1350 V
Temperatura pracy	260 K	265 K
Prąd ciemny anodowy ( $I_A$ )	2,3 nA (dla $U_{K-A} = 1150$ V)	2,1 nA (dla $U_{K-A} = 1380$ V)
Czułość ogólna fotokatody	158 $\mu$ A/lm	176 $\mu$ A/lm
Maksymalne napięcie $U_{K-A}$	1520 V	1900 V

Każdy z fotopowielaczy połączony był ze wzmacniaczem, który oprócz wzmacniania impulsów wychodzących z fotopowielacza pełnił funkcję dyskryminacji impulsów oraz ich formowania do poziomu TTL. Dyskryminacja miała na celu odcięcie impulsów niskopoziomowych, będących w głównej mierze wynikiem szumów własnych fotopowielacza. Taki zabieg zwiększał stosunek sygnału do szumu na wyjściu wzmacniacza. W celu zmniejszenia prądu ciemnego i tym samym wzrostu stosunku – sygnał/szum, fotokatoda fotopowielacza była chłodzona do odpowiednio niskiej temperatury (patrz tab. 3.1). Stosowane fotopowielacze szerzej scharakteryzowano w katalogu producenta (THORN EMI 1993).

Schemat stanowiska pomiarowego nr 1 przedstawiono na rysunku 3.2. Zasada działania całego urządzenia jest następująca. Fotony z próbki (PR) są rejestrowane i zamieniane przez fotopowielacz (PMT) na impulsy elektryczne, które z kolei są wzmacniane i kształtowane we wzmacniaczu (WZM) oraz rejestrowane przez licznik (LICZ) i komputer za pośrednictwem interfejsu (INT). Przez cylindryczny płaszcz (P), okalający fotopowielacz i wzmacniacz, przepływa ciecz (Chł) schładzana w klasycznej zamrażarce. Pozwala to obniżyć temperaturę fotopowielacza do 260 K. Odpowiednią stabilizację temperatury fotokatody fotopowielacza uzyskuje się przy pomocy czujnika temperatury umieszczonego w pobliżu fotokatody, który steruje pracą pompy cieczy chłodzącej. W komorze światłoszczelnej (K) umieszczony jest stolik obrotowy (SO) w kształcie okrągłej tarczy z sześcioma otworami, umożliwiającymi umieszczenie naczynek z próbkami pomiarowymi (PR). Taka konstrukcja umożliwia ręczne ustawianie wybranych próbek pod fotopowielaczem. Naczynka wykonane ze szkła, mają kształt półkuli o średnicy 48 mm. W celu zmniejszenia strat emitowanego przez próbkę bardzo słabego światła, naczynka pokryto warstwą odbijającą światło, a między próbką a fotopowielaczem umieszczono soczewkę skupiającą (S). Z tego samego względu w konstrukcji urządzenia

niezmiernie ważne było maksymalne przybliżenie badanej próbki do powierzchni fotopowielacza. W górnej części światłoszczelnej komory znajduje się kanalik (JN) z membraną gumową, umożliwiający iniekcję odpowiedniej substancji do uprzednio wybranego naczynka z próbką. Zarówno komora (K) jak i cylinder z fotopowielaczem oraz wzmacniaczem, są ekranowane w celu ochrony przed zakłóceniami elektromagnetycznymi. Interfejs (INT), licznik (LICZ) i zasilacz (Z), dający niskie (NN) oraz wysokie (WN) napięcie – stanowią moduły kasyety CAMAC firmy Polon.



Rys. 3.2. Schemat blokowy urządzenia (stanowisko nr 1) do pomiaru intensywności USL: PMT – fotopowielacz, WZM – wzmacniacz, P – płaszcz z cieczą chłodzącą, Chł – ciecz chłodząca, S – soczewka, K – komora światłoszczelna, SO – stolik obrotowy, PR – naczynka z próbkami, JN – otwór iniekcyjny, INT – interfejs, LICZ – licznik, Z – zasilacz



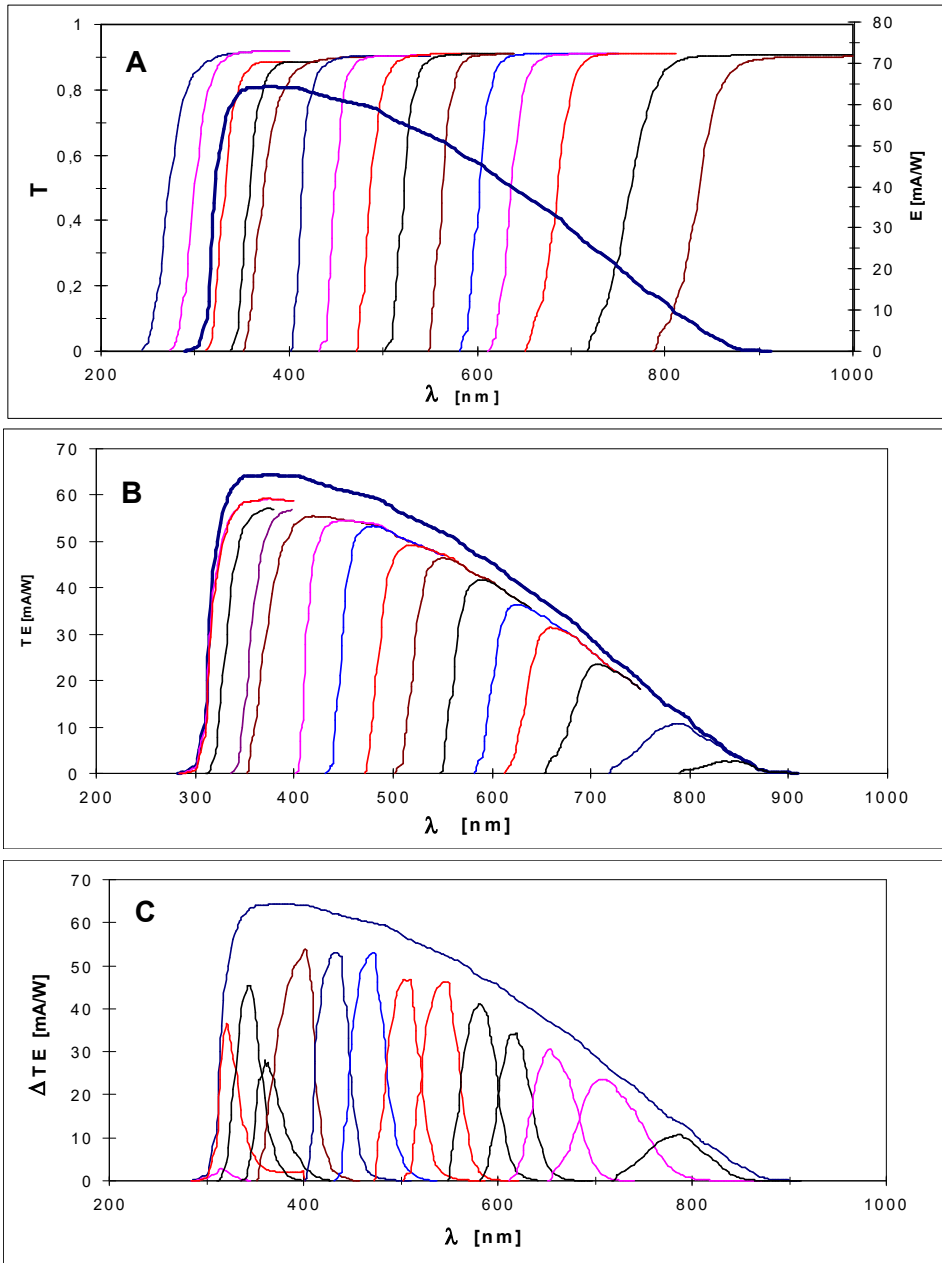
okienek tarczy (T). Tarcza z filtrami (T), fotopowielacz (PMT) oraz próbka (PR), są odizolowane od dostępu światła z zewnątrz. Pojemnik z higroskopijnym żelem (ŻEL) zabezpiecza przed zawilgoceniem tarczę (T) z filtrami. Optyczny czujnik (C) położenia startowego tarczy z filtrami zapewnia centralne położenie filtrów między fotopowielaczem a próbką. Fotopowielacz (PMT) jest chłodzony za pomocą termoelektrycznych modułów Peltiera (Ch). W moduł Peltiera wyposażony jest także stolik z próbką pomiarową, co umożliwia płynną zmianę temperatury badanej próbki w przedziale od 0 do 45°C. Stabilną pracę w zakresie zadanych temperatur (zarówno próbki jak i fotopowielacza) zapewnia regulator temperatury (RT), ustalający (poprzez czujniki sterujące zasilaczami ZS-1 i ZS-2) wymagane temperatury. Próbka pomiarowa (PR) umieszczana była w cylindrycznym, metalowym, chromowanym naczyniu o średnicy 48 mm i wysokości 30 mm.

Temperatura próbki była mierzona za pomocą sondy pomiarowej, umieszczonej w naczyniu z próbką, podłączonej do miernika temperatury (MT) i rejestrowana przez KOMPUTER-2. Zasilanie wysokiego napięcia (WN) oraz niskiego napięcia (Z-1), jest realizowane za pomocą kasety CAMAC firmy Polon. (Z-2) to oddzielny zasilacz napięcia symetrycznego wzmacniacza (WZ).

Zagadnienia związane z techniką zliczania pojedynczych fotonów z układów biologicznych za pomocą fotopowielaczy przedstawiono szerzej w pracach: Inaba 1988, Shimizu i in. 1973, Ellis 1999.

### **3.2. Pomiar rozkładu spektralnego ultrasłabej luminescencji**

Pomimo zastosowania bardzo czułej aparatury pomiarowej, niezwykle trudno jest uzyskać rozkład spektralny takiego promieniowania, którego natężenie przewyższa tło zaledwie dwa do pięciu razy. Gdyby umieścić pomiędzy detektorem, a próbką – filtry pasmowe, przepuszczające promieniowanie w określonym wąskim przedziale częstości, to ograniczałoby to bardzo sygnał pomiarowy i tak słabego już promieniowania. Ponadto filtry pasmowe (interferencyjne) powodują rozproszenie promieniowania elektromagnetycznego padającego na nie pod szerszym kątem. Z tego też powodu zastosowana została metoda filtrów granicznych (cut-off filters) (Inaba 1988, Sławiński 1989 – s.148–154, Tryka 1998), zaproponowana w 1965 r. przez Wassileva (Vassilev 1965). W metodzie tej stosowane są filtry przepuszczające promieniowanie w długofalowej części widma, z ostrą granicą krótkofalową. Wykorzystując szereg takich filtrów, dla których długości fal granicznych pokrywają całe pasmo pomiarowe (ograniczone najczęściej charakterystyką detektora) w przybliżeniu w stałych przedziałach długości fal, możemy z różnicy transmitancji kolejnych sąsiednich filtrów uzyskać pasmowe widmo spektralne w interesującym nas przedziale długości fal.



Rys. 3.4. Charakterystyka spektralna układu pomiarowego z filtrami typu cut-off: A – transmitancja (T) filtrów firmy SCHOTT o grubości 1 mm na tle czułości fotopowielacza THORN EMI 9558 (E); B – zmodyfikowane czułości układu filtr + fotopowielacz (T·E); C – różnica transmitancji sąsiednich filtrów przemnożona przez czułość fotokatody ( $\Delta T \cdot E$ ). Rysunek sporządzono na podstawie danych katalogowych stosowanego fotopowielacza i filtrów

W przedstawionych w niniejszej pracy pomiarach rozkładu spektralnego ultrasłabej luminescencji stosowano 20 filtrów typu „long pass filters” niemieckiej firmy SCHOTT. W Aneksie 1 umieszczono oznaczenia stosowanych filtrów oraz graniczne długości fal odpowiadające połowie transmitancji maksymalnej. Zależność transmitancji – T wybranych filtrów SCHOTT i czułości spektralnej – E stosowanego fotopowielacza od długości fali przedstawia rysunek 3.4A. Transmitancję określamy jako stosunek przenoszonej przez promieniowanie energii opuszczającej filtr do energii padającej na powierzchnię filtru. Natomiast czułość spektralna fotopowielacza, określana jest jako stosunek natężenia jego fotoprądu do mocy światła padającego na fotokatodę. Wartość obu tych wielkości jest wyznaczana dla danej długości fali. Jeżeli przemnożymy czułość fotopowielacza przez transmitancję stosowanych filtrów, to otrzymamy zmodyfikowaną czułość układu filtr – fotopowielacz (rys. 3.4B).

Natężenie fotoprądu w obecności filtru umieszczonego na drodze promieniowania padającego na fotopowielacz można określić następującym wyrażeniem:

$$i_k = \gamma \int_{\lambda_k}^{\lambda_\sigma} E(\lambda) I_\lambda(\lambda) T_\lambda(\lambda) d\lambda ,$$

gdzie:

- k – numer filtru,
- $\lambda_k$  – krótkofalowa granica przepuszczalności filtru,
- $\lambda_\sigma$  – długofalowa granica czułości fotopowielacza,
- $I_\lambda(\lambda)$  – natężenie oświetlenia czyli gęstość promieniowania na jednostkę zakresu długości fali,
- $E(\lambda)$  – spektralna czułość fotopowielacza,
- $\gamma$  – współczynnik proporcjonalności zależny od wyboru jednostek.

Jeśli wykona się pomiary dla dwóch kolejnych filtrów ustawionych na drodze analizowanego promieniowania (rys. 3.4C), to różnica odpowiadających im fotoprądów charakteryzuje natężenie promieniowania emitowanego przez badany obiekt w obszarze między krótkofalowymi granicami filtrów:

$$\Delta i_{k1} = i_k - i_1 = \int_{\lambda_k}^{\lambda_\sigma} E I_\lambda (T_k - T_1) d\lambda .$$

Dla większości filtrów maksymalna wartość przepuszczalności jest jednakowa i dla danego filtru zaczyna się od pewnej długości fali  $\lambda_{k1}$ , co pozwala zmienić przedział całkowania  $\lambda_\sigma$  na  $\lambda_{k1}$ . Wyłączając przed znak całki  $(I_\lambda)_{k1}$  – średnią w przedziale  $(\lambda_k - \lambda_{k1})$ , otrzymuje się:

$$\Delta i_{kl} = (I_\lambda)_{kl} \int_{\lambda_k}^{\lambda_{kl}} E (T_k - T_l) d\lambda.$$

Różnica prądów  $\Delta i_{kl}$  jest równa iloczynowi średniego natężenia świecenia z przedziału od  $\lambda_k$  do  $\lambda_{kl}$  i całki, która okazuje się być stałym współczynnikiem aparaturowym  $c_{kl}$  dla danej pary filtrów. Współczynniki

$$c_{kl} = \int_{\lambda_k}^{\lambda_{kl}} E (T_k - T_l) d\lambda$$

obliczono dla kompletu stosowanych filtrów na podstawie ich transmitancji katalogowych oraz krzywej czułości spektralnej fotopowielacza EMI 9558, stosując odpowiedni program komputerowy. Ostatecznie średnie natężenie luminescencji w danym przedziale określamy jako:

$$(I_\lambda)_{kl} = \frac{\Delta i_{kl}}{c_{kl}}.$$

W praktycznym zastosowaniu wartość  $\Delta i_{kl}$  zastępuje się różnicą liczby impulsów zarejestrowanych dla dwóch kolejno wstawionych filtrów przed okienko fotopowielacza.

Zasadniczą niedogodnością powyższej metody pomiarowej, pozwalającej uzyskać rozkład widma USL jest: ograniczona rozdzielczość spektralna ( $\Delta\lambda \geq 10$  nm) oraz dość mała powtarzalność wyników, co wymaga odpowiednio wielu powtórzeń pomiarów. Wydłużony okres cyklu pomiarowego stanowi istotny problem w badaniach struktur, w których USL zmienia się dynamicznie. Jednak metoda filtrów granicznych pozwala mierzyć rozkład spektralny USL z największym stosunkiem sygnału do szumu.

### 3.3. Obrazowanie ultrasłabej luminescencji

Pomiar ultrasłabej emisji fotonowej z wykorzystaniem metod zliczania pojedynczych fotonów, opisanych w poprzednich podrozdziałach, pozwala jedynie na obserwację sumarycznego sygnału emitowanego przez badany obiekt znajdujący się w polu widzenia fotokatody. Nie daje to zatem możliwości przypisania emisji do danego obszaru i obserwacji zmian emisji zachodzących w poszczególnych fragmentach badanego organizmu. Aby uzyskać możliwość zarejestrowania zmian natężenia emisji promieniowania elektromagnetycznego dochodzącego z powierzchni badanych obiektów w funkcji położenia, tzn.  $I = f(x,y)$ , można zastosować metodę obrazowania w technice zliczania pojedynczych fotonów (Single Photon Counting Imaging – SPCI) (Kobayashi 2014). Należy przy tym podkreślić, że o ile normalna fotografia ukazuje obraz

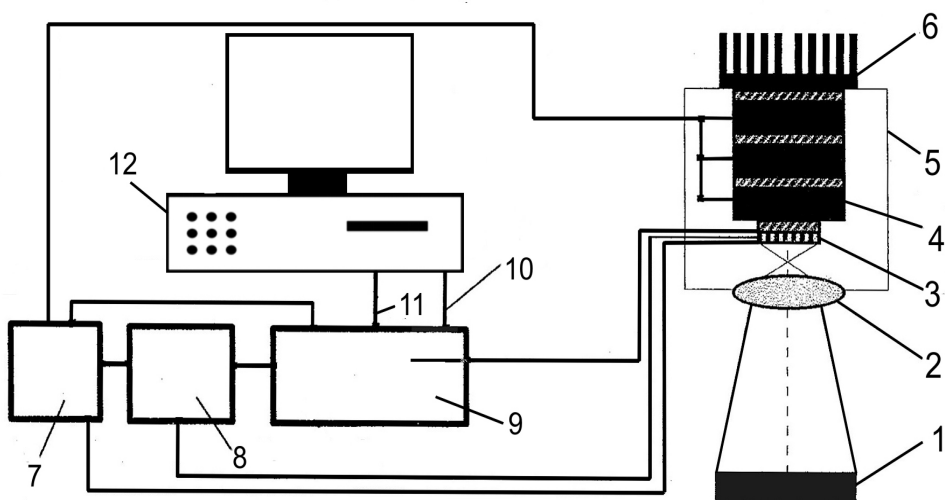
przedmiotu w świetle odbitym, to obraz luminescencyjny stanowi zapis emisji własnej obiektu, rejestrowany w ciemności. Tak więc metoda SPCI pozwala na uzyskanie informacji o zmieniających się w czasie i przestrzeni cechach obserwowanego układu biologicznego.

Zarówno powierzchniowy rozkład luminescencji  $I = f(x,y)$ , jak i pozostałe parametry świecenia, tj. kinetyka zmian intensywności, sumaryczne natężenie światła, rozkład spektralny oraz rozkład statystyczny liczby zliczanych impulsów w wybranym przedziale czasu, jest powiązany z parametrami biochemicznymi oraz fizjologicznymi. Wskazują na to zmiany wartości liczbowych tych wielkości w różnych warunkach stresu, np. radiacyjnego, temperaturowego czy oksydacyjnego (Kobayashi i wsp. 1999). Zatem cały zbiór wymienionych parametrów ultrasłabej luminescencji, lub któryś wybrany spośród nich, może być wykorzystany jako wskaźnik stopnia zaburzenia homeostazy. Rozkład powierzchniowy luminescencji pozwala dodatkowo zlokalizować centra tych zaburzeń.

Przedstawiana technika umożliwia rejestrację zarówno ultrasłabej emisji promieniowania elektromagnetycznego ( $10^2$ – $5 \cdot 10^6$  fotonów/( $\text{cm}^2\text{s}$ )), jak również promieniowania fluorescencyjnego ( $10^7$ – $10^{10}$  fotonów/( $\text{cm}^2\text{s}$ )). Dla światła o długości fali  $\lambda = 550$  nm daje to sumaryczny zakres zastosowania dla powierzchni o natężeniu oświetlenia  $10^{-9}$ – $10^{-2}$  luxa (Suzuki i Inaba 1989). Schemat aparatury stosowanej w badaniach z wykorzystaniem techniki obrazowania luminescencyjnego (SPCI) przedstawiono na rysunku 3.5. Badania przeprowadzono w Instytucie Chemii i Elektrochemii Technicznej Politechniki Poznańskiej. Urządzenie obrazujące („Night Owl” LB 981), wyposażone jest w wolno odczytującą, oświetlaną od tyłu matrycę CCD, chłodzoną płytkami Peltiera i powietrzem. Elementy te umieszczone są w światłoszczelnej komorze pomiarowej, w której umieszcza się badany obiekt (rys. 3.6). Urządzenie współpracuje z programem Winlight, który umożliwia akwizycję i obróbkę uzyskanych danych. Możliwości programowe WinLight zostały rozszerzone o zestaw narzędzi programistycznych FCT v. 1.1 (Górski i wsp. 2002). Przetwornik obrazujący CCD (Charge Coupled Device) w komorze jest akumulującą pamięcią obrazu. Oznacza to, że każdy rozbłysk, który ma miejsce w czasie „zliczania” fotonów z próbki jest zapamiętywany, z jednoczesną informacją o jego natężeniu (jako odpowiedniej wielkości ładunek) i o położeniu w przestrzeni XY. Wygenerowany ładunek na drodze efektu fotoelektrycznego w każdym pikselu, tj. komórce stanowiącej element światłoczuły matrycy półprzewodnikowej CCD jest zamieniony na sygnał napięcia, który następnie zostaje przetworzony w postać cyfrową. Reprezentacja cyfrowa obserwowanego obrazu jest transferowana do komputera, gdzie zostaje poddana kolejnej obróbce. Uzyskiwane obrazy są zapisywane w 16-sto bitowej skali szarości w formacie FTS. Kolorowy obraz badanego obiektu uzyskuje się w procesie pseudokoloryzacji, gdzie poszczególnym barwom odpowiadają dane natężenia

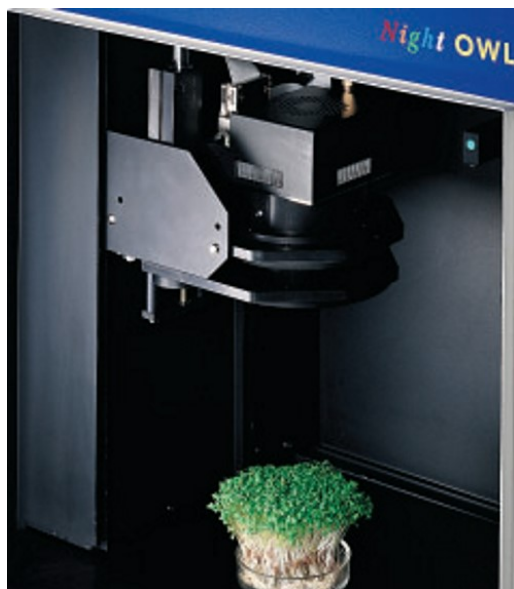


świecenia. W wykorzystywanej aparaturze Molecular Light Imager rozdzielczość przetwornika CCD wynosiła  $512 \times 494$  pikseli, przy możliwych rozmiarach próbki od  $3 \times 3$  cm do  $25 \times 25$  cm. W danym cyklu pomiarowym obserwacji świecenia glonów, w światłoszczelnej komorze umieszczano zazwyczaj kilka porcelanowych kuwet o rozmiarach  $4 \times 6$  cm z roztworem APW i badanymi roślinami *Nitellopsis obtusa*. Dla ewentualnej korekty znajdował się tam również wzorzec luminescencyjny o stałym natężeniu świecenia. Zakres widmowy mierzonego promieniowania mieścił się w przedziale 200–1100 nm, zaś wydajność kwantowa wynosiła 65% dla  $\lambda = 550$  nm.



Rys. 3.5. Schemat urządzenia obrazującego (Molecular Light Imager) "Night Owl" produkcji EG&G.BERTHOLD: 1 – próbka; 2 – obiektyw; 3 – matryca CCD; 4 – chłodziarka termoelektryczna Peltiera ( $-73^{\circ}\text{C}$ ); 5 – kamera; 6 – radiator z wentylatorem; 7 – zasilacz; 8 – termostat; 9 – interfejs kamery; 10 – łącze transmisji sygnałów sterujących kamerą; 11 – łącze transmisji obrazu; 12 – komputer z oprogramowaniem sterującym

Optymalne zarejestrowanie obrazu luminescencyjnego wiąże się z wieloma trudnościami eksperymentalnymi, z których najbardziej istotnym elementem jest właściwy dobór czasu „zliczania”, czyli akwizycji impulsów świetlnych z powierzchni obiektu. Należy możliwie precyzyjnie przewidzieć dynamikę procesów, którym towarzyszy ultrasłabe świecenie. Zbyt krótki czas może skutkować niewłaściwą oceną (np. wnioskiem, że mamy do czynienia z brakiem emisji), natomiast zbyt długi okres zbierania impulsów uniemożliwia zaobserwowanie szybkich zmian; następuje sumowanie krótkich rozbłysków. Zazwyczaj stosowane czasy akwizycji wynoszą od kilku do kilkunastu minut.



Rys. 3.6. Światłoszczelna komora pomiarowa urządzenia Night OWL (Berthold Technologies 2015)

Przy obrazowaniu obiektów znajdujących się pod powierzchnią wody (co ma miejsce dla komórek glonów *Nitellopsis obtusa*), pojawiają się dodatkowe efekty z tym związane. W przypadku obiektu punktowego, znajdującego się w powietrzu, do detektora dociera światło w obrębie kąta bryłowego, który ograniczony jest wielkością powierzchni detektora rejestrującej wiązkę padającą. Natomiast gdy źródło punktowe światła znajduje się w innym ośrodku przezroczystym (np. w wodzie), wówczas światło padające na powierzchnię wody wychodzi z niej pod kątem większym od kąta padania, przez co część światła nie dociera do powierzchni detektora. Natomiast światło emitowane z próbki pod kątem większym od kąta granicznego ze względu na zjawisko całkowitego odbicia wewnętrznego zostanie zatrzymane wewnątrz cieczy, dając artefakty w postaci świecących krawędzi kuwet. Dlatego do analizy obrazów luminescencyjnych komórek glonów *Nitellopsis obtusa* zanurzonych w wodzie wybierano rośliny odległe od krawędzi ścianek naczynia, oraz te obszary komórek, które nie stanowiły miejsc ich skrzyżowań. Unikano w ten sposób sumowania się emitowanego światła lub niekontrolowanego pochłaniania fotonów przez przesłaniające części roślin.

## 4. Charakterystyka i preparatyka badanego materiału

### 4.1. Rośliny *Nitellopsis obtusa*

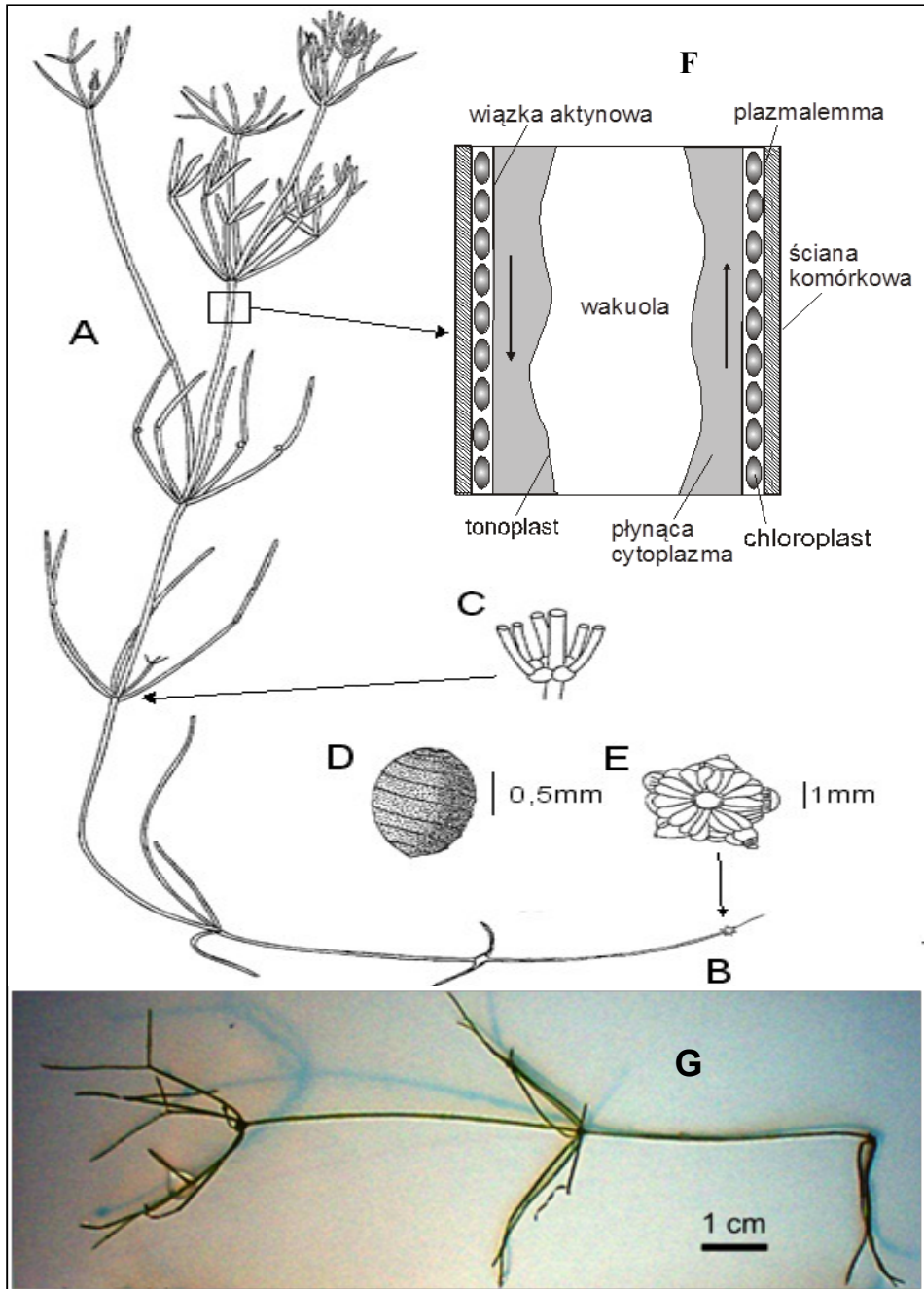
Badania prowadzono głównie na glonach *Nitellopsis obtusa* (Desvaux) J. Groves. Są to rośliny z gromady Zielenic (*Chlorophyta*), rząd Ramienice (Charales) (Pałeczaty i Pukacz 2008, Feist i in. 2005) rodziny Characeae, podrodziny *Charoideae*, stosowane w wielu ośrodkach jako materiał modelowy (Tazawa 2011).

Do badań wybrano te rośliny, gdyż są one dobrze poznane, zwłaszcza w aspekcie ich budowy. Długie, cylindryczne komórki, łatwość hodowli, jak i też możliwość obserwacji ruchu cytoplazmy są powodem, że na roślinach *Characeae* wykonano bardzo wiele badań, głównie elektrofizjologicznych. Nie są znane wcześniejsze badania ultrasłabej luminescencji przeprowadzane na tych roślinach, dlatego też ich wykonanie wydało się bardzo interesujące.

Glony *Nitellopsis obtusa* (rys. 4.1) zbudowane są z zielonej plechy oraz bezbarwnych chwytników (ryzoidów), przytwierdzających roślinę do podłoża. Zieloną plechę stanowią komórki międzywęzłowe nibyłodygi rozdzielone węzłami, z których promieniście wyrastają nibyliście z przylistkami. Długość rośliny może osiągać 1 m. Średnica komórek międzywęzłowych dochodzi do 1,5 mm, natomiast długość tych komórek może przekraczać 10 cm.

*Nitellopsis obtusa* jest rośliną wieloletnią (w warunkach mniej korzystnych może być jednoroczna) oraz dwupienną. Okazy żeńskie są rzadsze od męskich. Od połowy lata do późnej jesieni wytwarzają plemniki i lęgnie występujące przy nibylistkach. Zapłodnione lęgnie przekształcają się w oospory (rys 4.1 D), które po opadnięciu na dno mogą dać początek nowej roślinie. Jednak rośliny te najczęściej rozmnażają się wegetatywnie za pomocą gwiazdzistych bulwek (rys. 4.1 E), powstających w dolnych częściach nibyłodygi lub w chwytниках. Charakterystyczna budowa bulwek przyczynia się do dość łatwego odróżnienia *Nitellopsis obtusa* od innych gatunków rodziny Characeae (Dąbbska i Karpiński 1954, Pałeczaty i Pukacz 2008).

Komórki międzywęzłowe (rys. 4.1 F) są wielojądrzastymi komórczakami. Oddzielająca je od otoczenia ściana komórkowa jest nieokorowana, co umożliwia mikroskopowe obserwacje ruchu cytoplazmy. W zewnętrznej warstwie komórki, między plazmalemmą, a wiązką aktynową, znajduje się przytwierdzona do tej drugiej – warstwa chloroplastów. Inne organelle komórkowe znajdują się w części cytoplazmatycznej komórki. Część organelli podlega ruchowi cyrkulacyjnemu wzdłuż komórki, a pozostałe przytwierdzone są do wiązki aktynowej poprzez miozynę cytoplazmatyczną. Ruch cytoplazmy jest związany z oddziaływaniem wiązki aktynowej z cytoplazmatycznymi cząstkami



Rys. 4.1. Widok rośliny *Nitellopsis obtusa* A) plecha, B) chwytник, C) węzeł, D) oospora, E) bulwka, F) przekrój podłużny przez komórkę międzywęzłową (strzałki oznaczają kierunek przepływu cytoplazmy), G) zdjęcie glonu (badania własne)

miozyny (Shimmen i Yokota 2004, Peremyslov i wsp. 2015). Wnętrze komórki stanowi ograniczona tonoplastem wakuola (wodniczka), zawierająca sok komórkowy, w którego skład wchodzi substancje zapasowe oraz niepotrzebne już produkty metabolizmu. Węzły (rys. 4.1 C) oddzielające komórczaki, zawierają niewielkie komórki węzłowe oraz umiejscowione w złączach międzykomórkowych, wypełnione cytoplazmą – kanały o średnicy około 50 nm zwane plazmodesmami. Węzły pośredniczą w transporcie jonów, substancji odżywczych oraz impulsów elektrycznych np. potencjałów czynnościowych (Sibaoka 1966).

Głony *Nitellopsis obtusa* rosną prawie wyłącznie w wodach słodkich, najczęściej w jeziorach na głębokości 1–7 m. Są gatunkiem szeroko rozpowszechnionym na półkuli północnej, najbardziej zaś w Europie pn. i Azji pn.

Rośliny do badań pozyskiwano z jeziora Zagłębcze koło Lublina na pojezierzu Łęczyńsko-Włodawskim, gdzie dość obficie są rozpowszechnione (Fijałkowski 1959, Karczmarz 1975, Karczmarz 1980, Urbaniak i wsp. 2011). Wyławiano je ze strefy przybrzeżnej, z głębokości 1–3 m.

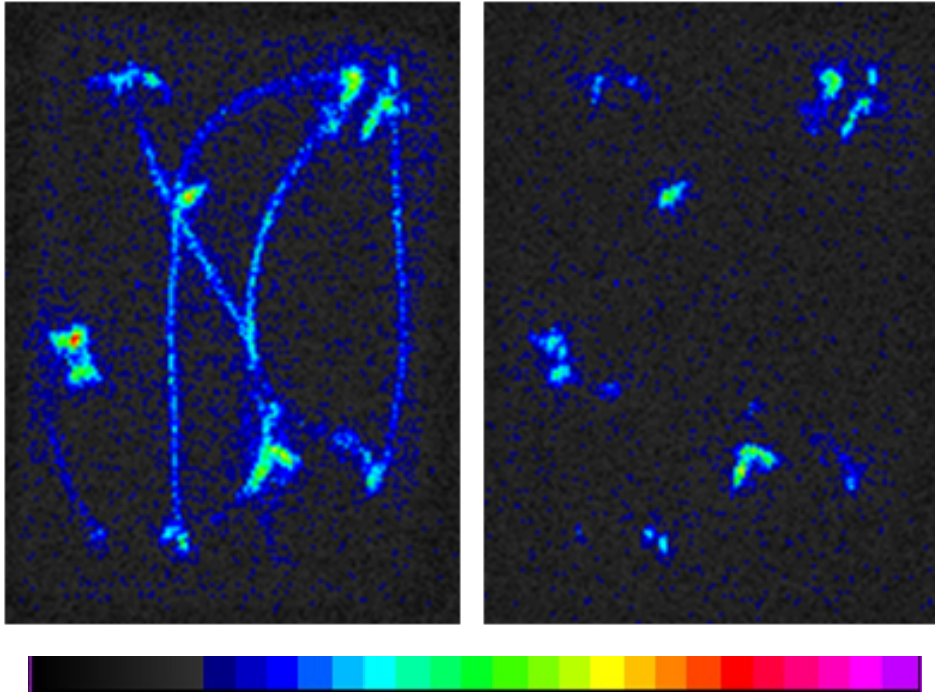
## 4.2. Przygotowanie roślin do badań

Rośliny *Nitellopsis obtusa*, pozyskiwane z jeziora Zagłębcze, hodowano w akwariach, w wodzie z jeziora o pH od 7 do 8 i temperaturze 16–23°C, w warunkach naturalnego oświetlenia. Przed pomiarami rośliny przepłukiwane były wodą kranową i destylowaną oraz umieszczane w naczynkach pomiarowych (rozdział 3.1) w formie niezależnie żyjących fragmentów roślin.

W najwcześniejszym okresie badań komórek *Nitellopsis obtusa* dobierano 30 młodych komórek międzywęzłowych o podobnej długości do 5 centymetrów i oddzielano je od reszty rośliny. Komórkom tym obcinano także nibylistki znajdujące się w węzłach komórkowych aby w jak największym stopniu ujednoczyć próbkę pomiarową. Jednak jak okazało się podczas rejestracji obrazowania luminescencyjnego za pomocą aparatury Molecular Light Imager, procedura odcinania nibylistków jest niewskazana, gdyż na skutek mechanicznego ich uszkodzenia wprowadzano zakłócenia w spontanicznej ultrasłabej luminescencji komórek. W miejscach uszkodzeń obserwowano dodatkową, dużo większą intensywność emisji fotonowej i emisja ta utrzymywała się na wysokim poziomie znacznie dłużej niż emisja pozostałych części roślin (rys. 4.2). Stwierdzono zatem, że obrazowanie luminescencyjne może służyć do wykrywania uszkodzeń mechanicznych w organizmach żywych co zostało również potwierdzone między innymi przez Chen i wsp. (2003) oraz Morker i Roberts (2011). W dalszych etapach pracy badawczej do pomiarów pobierano takie fragmenty roślin, które składały się tylko z dwóch lub trzech komórek międzywęzłowych stanowiących integralną całość i nie dokonywano żadnych obcięć nibylistków.

Próbka zawierała w sumie (najczęściej) po 30 komórek międzywęzłowych, młodych, o niewielkich długościach – do 5 cm. Rośliny w naczyniu pomiaro-

wym zalewano 20 ml APW (artificial pond water) o składzie: 0.1mM KCl; 0.1mM NaCl; 0.1mM CaCl<sub>2</sub>, buforowanym 20 mM Hepesem, którego pH było ustalane na poziomie 7.4 –7.5 przy pomocy 10% NaOH.



Rys. 4.2. Obrazy luminescencyjne komórek *Nitellopsis obtusa* z obciętymi nibylistkami otrzymane w odstępie 0,5 godziny. Czas akwizycji wynosił 10 min. Widoczne mocne i utrzymujące się świecenie z obszaru uszkodzonych mechanicznie węzłów. Maksimum luminescencji na skali wynosi 18 zliczeń/piksel

Część próbek przetrzymywano około 30 minut w roztworze APW zawierającym dodatkowo antybiotyki: 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$  streptomycyny i 20  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$  penicyliny G (Gędziorowska 1983). Celem tego zabiegu była eliminacja bakterii, które mogły występować na ściankach komórkowych roślin i dawać niepożądaną własną emisję USL. W celu sprawdzenia czy stosowane antybiotyki nie mają ubocznego wpływu na funkcjonowanie komórek, wykonywano dodatkowe badania ruchu cytoplazmy i USL bezpośrednio po dodaniu antybiotyków do roztworu z roślinami. Nie stwierdzono (w określonych powyżej warunkach stężeń i czasu) żadnych zaburzeń stanu funkcjonalnego wywołanego działaniem antybiotyku.

Wyhodowane szczepy bakterii i Zielenic (sposób hodowli omówiono w Aneksie II), bytujące na ściankach glonów *Characeae* zostały przebadane pod kątem intensywności ich ultrasłabej luminescencji. Stwierdzono, że intensywność ich świecenia jest znikomo mała w stosunku do sygnału uzyskiwanego z roślin. Z tego też powodu, dla wielu badanych próbek rezygnowano z traktowania ich antybiotykami.

Rośliny, dla których rejestrowano – nie indukowaną światłem – ultrasłabą, spontaniczną luminescencję, przetrzymywane były przez kilkanaście godzin przed pomiarem w światłoszczelnej komorze aparatury pomiarowej.

### **4.3. Izolowanie cytoplazmy, chloroplastów oraz ścianek komórkowych**

Otrzymywanie wyizolowanej cytoplazmy z komórek przeprowadzono w dwojaki sposób. Dla uzyskania cytoplazmy bogatej w chloroplasty, po obcięciu komórki z jednego jej końca pozwalano wypływać cytoplazmie samorzutnie i delikatnie wyciskano ją do roztworu APW, aż do chwili kiedy ścianki komórki stawały się możliwie najslabiej zabarwione na zielono. Procedurę „wyciskania” cytoplazmy kończono w sytuacji, gdy pozostawała ona w komórce na odcinku kilku milimetrów, po to aby uchronić się od ewentualnych zanieczyszczeń zgromadzonych na zewnętrznej stronie ściany komórkowej, które przy całkowitym wyciśnięciu mogłyby przedostać się do roztworu.

Cytoplazmę bogatszą w mitochondria otrzymano, dodając do roztworu mannitol o stężeniu 0,3 M, jak również przetrzymując wcześniej żywe rośliny 30 minut w 0,3 M mannitolu. Sposób otrzymywania cytoplazmy uboższej w chloroplasty, polegał na obcięciu końca komórki zamocowanej w pozycji pionowej, z której cytoplazma wyciekała samorzutnie, pod wpływem siły grawitacji (Kuroda 1964) i nie zawierała chloroplastów zakotwiczonych w tzw. ektoplazmie, w obszarze przyściankowym (Zurzycki 1979).

Wydzielenie chloroplastów z cytoplazmy uzyskiwano przez odwirowanie próbki, trwające 10 minut z przyspieszeniem  $2000 \times g$ .

Ścianki komórkowe uzyskiwano poprzez całkowite wyciśnięcie soku komórkowego oraz cytoplazmy, przy zastosowaniu możliwie największej siły ściskającej w celu pozbycia się zakotwiczonych tuż przy ścianie chloroplastów.

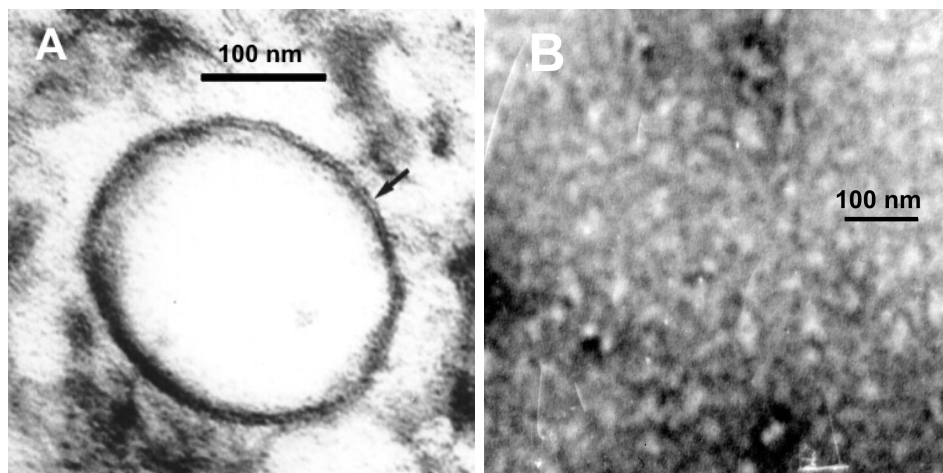
### **4.4. Otrzymywanie frakcji błonowych i rybosomalnych**

W celu otrzymania frakcji wzbogaconej we fragmenty błon komórkowych z komórek roślinnych *Characeae*, materiał w ilości około 5 gramów świeżej masy roślinnej – wstępnie rozdrobniony nożyczkami – homogenizowano w 4 ml buforze, w schłodzonym kubku homogenizatora Pottera – Elvehjema (całoszklanym), przy pomocy robota laboratoryjnego typu 309. Bufor Tris – HCl o stężeniu 0,1 M oraz pH 7,5, zawierał 1 mM EDTANa<sub>2</sub>.

Homogenizację prowadzono do chwili rozdrobnienia wszystkich komórek i ich fragmentów (około 5 min). Postępowanie to powtarzano z czterema kolejnymi porcjami materiału, po 5 g każda. Otrzymany homogenat odwirowywano w wirówce MPW-375. Do wirowania używano rotora 12 × 10 ml, schłodzonego do -90°C. Wirowanie trwało 15 minut przy 12 tys. obr./min (14000 × g).

Po wirowaniu osad wyrzucano, a supernatant przez 3 h poddawano wirowaniu w ultrawirówce Beckmana L 60, w rotorze 70.1 Ti 8 × 10 ml, stosując 28 tys. obrotów na minutę (68000 × g). Osad traktowano jako frakcję homogenatu, wzbogaconą w materiał błon komórkowych. Po sporządzeniu zawiesiny z tego osadu, wierzchnią warstwę roztworu traktowano jako frakcję lipidową. Uzyskany po wirowaniu supernatant poddawano ponownemu wirowaniu w ultrawirówce (105 tys. × g), przez następne 3 h. Uzyskany po drugim wirowaniu osad traktowano jako frakcję mikrosomalną wzbogaconą w rybosomy.

W celu potwierdzenia natury uzyskanych frakcji, dokonano ich analizy przy użyciu transmisyjnego mikroskopu elektronowego TESLA BS-500. Przykładowe elektronogramy frakcji błonowej i rybosomalnej przedstawiono na rysunku 4.3 (preparatykę materiału badanego omówiono w Załączniku III). Z uwagi na brak literatury szczegółowej, dotyczącej frakcjonowania homogenatów z tak specyficznego materiału jakim są glony należące do rodziny roślin Characeae, kierowano się przesłankami ogólnymi i pracą Kinne-Safran i Kinne (1989). Opisane frakcje komórkowe otrzymano w Instytucie Biochemii UMCS.



Rys. 4.3. Zdjęcia frakcji komórkowych glonów *Nitellopsis obtusa* uzyskane za pomocą mikroskopu elektronowego TESLA BS-500. A) – frakcja błonowa, strzałka wskazuje dwuwarstwę lipidową charakterystyczną dla obrazu błon; wykorzystano technikę cienkich skrawków, B) – frakcja rybosomalna, niektóre jasne struktury o odpowiednim kształcie są pojedynczymi rybosomami; wykorzystano technikę negatywowego barwienia



## 5. Spontaniczna emisja fotonowa z wybranych układów żywych na przykładzie roślin *Nitellopsis obtusa*

### 5.1. Luminescencja opóźniona

Indukowana światłem luminescencja z komórek roślinnych wykazuje długoczasowy zanik, po czym poziom świecenia staje się stacjonarny. Dla czasu wyświecania do około 10 ns emisja nosi nazwę fluorescencji. Dla czasu większego niż ta wartość mamy do czynienia z fosforescencją oraz długoczasową luminescencją. W początkowym przedziale czasu zanik emisji jest bardzo gwałtowny. W czasie dłuższym niż 1 ms zanik staje się wolniejszy i ma charakter długotrwałego wyświecania; stała czasowa rośnie w miarę upływu czasu. Zanik ten zwany jest opóźnioną luminescencją (ang. delayed luminescence – Jursinic 1986), trwa przeważnie do kilku godzin, po czym emisja staje się stacjonarna i jej poziom na ogół przewyższa kilkakrotnie tło aparatury pomiarowej.

Na podstawie wielu opublikowanych danych eksperymentalnych można powiedzieć, że krzywa zaniku opóźnionej luminescencji nie ma charakteru pojedynczej eksponenty i można ją opisać jako wynik nałożenia się wielu eksponent (Lavorel 1975, Bajpai i Bajpai 1992) lub jako funkcję hiperboliczną (Gu i Popp 1992, Mathew i Kumar 1992).

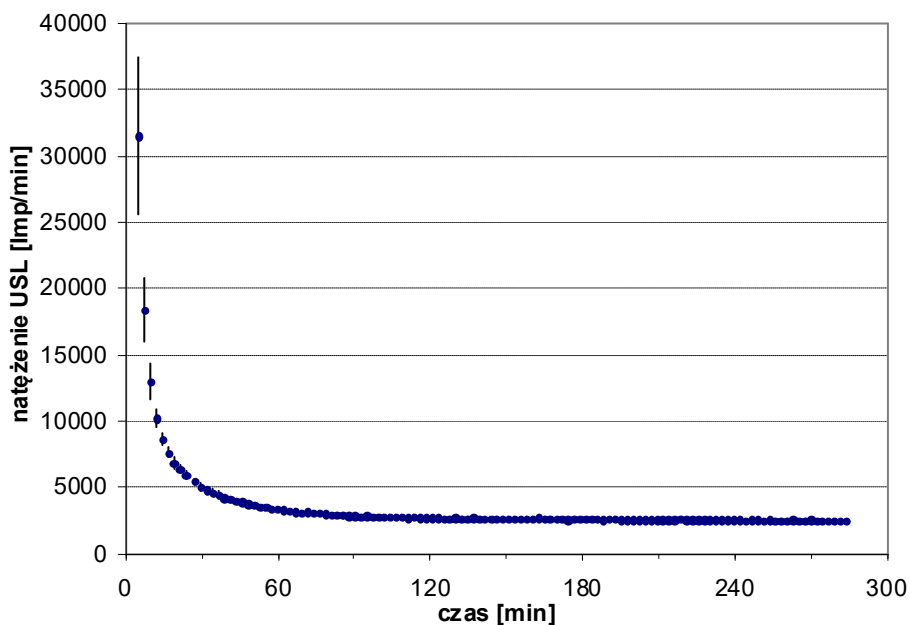
Analizując kształt krzywej zaniku, można spekulować na temat charakteru procesów odpowiedzialnych za wyświecanie. Zwykły, wykładniczy charakter zaniku promieniowania można obserwować wówczas, gdy wzbudzony jest tylko pojedynczy stan. Dla wielu możliwych stanów występuje krzywa inna niż eksponenta. Konwencjonalna teoria przewiduje, że wszystkie deekscytacje są niezależne, zaś teoria zakładająca istnienie koherentnej natury promieniowania przewiduje hiperboliczny charakter wyświecania, jako efekt nakładania się światła wielu źródeł o wykładniczo malejących intensywnościach (z różnymi czasami połowicznego zaniku), w których każde długości fal (mody) są ze sobą ściśle sprzężone.

Teoria tłumacząca możliwość występowania koherencji w systemach biologicznych oparta jest na modelu Fröhlicha (Fröhlich 1968, Fröhlich 1983). Krzywą typu hiperboli, opisaną jako przebieg zanikającej emisji oscylatora sprzężonego koherentnie z emitowanym polem, objaśnia model Li i Poppa (Li 1981, Li i Popp 1983), rozwijany dalej przez Bajpai i wsp. (1998). Opisana jest ona zasadniczo równaniem  $I(t) = I_0 + I_1(t + t_0)^{-m}$ , gdzie:  $t$  – czas obserwacji,  $t_0$  – przedział czasu między końcem naświetlania, a pierwszym punktem pomiarowym,  $m$  – parametr zaniku ( $1 < m < 3$ ),  $I_0$  – poziom stacjonarnej emisji przy  $t \rightarrow \infty$ ,  $I_1$  – stała zależna od intensywności wzbudzenia, długości fali oraz parametru  $m$ . Taki charakter krzywej (oraz przedział wartości

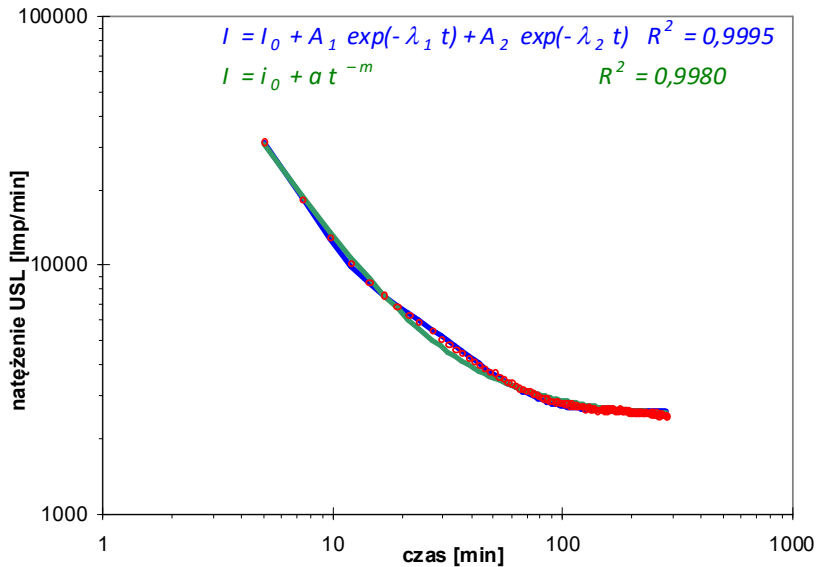
parametru  $m$ ) występują dla czasu  $(t + t_0)$ , mieszczącego się w przedziale od około 1s do kilku minut. Światło wzbudzające może być polichromatyczne – charakter krzywej nie zależy od częstotliwości światła wzbudzającego.

Luminescencję opóźnioną dla roślin Characeae przedstawiono w pracy (Jaśkowska i wsp. 2001a). Rośliny były hodowane w warunkach laboratoryjnych, w akwarium, przy naturalnym dostępie światła w cyklu dzień-noć. Pobierane do badań – w takich warunkach – rośliny wykazywały w światłoszczelnej komorze pomiarowej długotrwałe wyświecanie, trwające od 3,5 do 6 godzin. Po tym czasie rośliny (30 komórek międzywęzłowych w każdej próbce) charakteryzowały się stacjonarnym poziomem emisji, przekraczającym kilkakrotnie poziom tła aparatury.

Wyniki pomiarów zaniku luminescencji dla czasu od 5 minut do 4,7 godzin (od chwili umieszczenia w komorze światłoszczelnej), uśrednione z ośmiu niezależnych serii pomiarowych, przedstawione zostały na rysunkach 5.1 i 5.2.



Rys. 5.1. Natężenie USL (liczba zliczeń w czasie 1 min) w funkcji czasu dla roślin *Nitellopsis obtusa*. Czas  $t = 0$  oznacza moment umieszczenia roślin w zaciemnionej komorze pomiarowej (pierwszy punkt pomiarowy otrzymano dla  $t = 5$  min). Punkty pomiarowe uśredniono z 8 niezależnych serii pomiarowych. Pionowe kreski oznaczają odchylenia standardowe

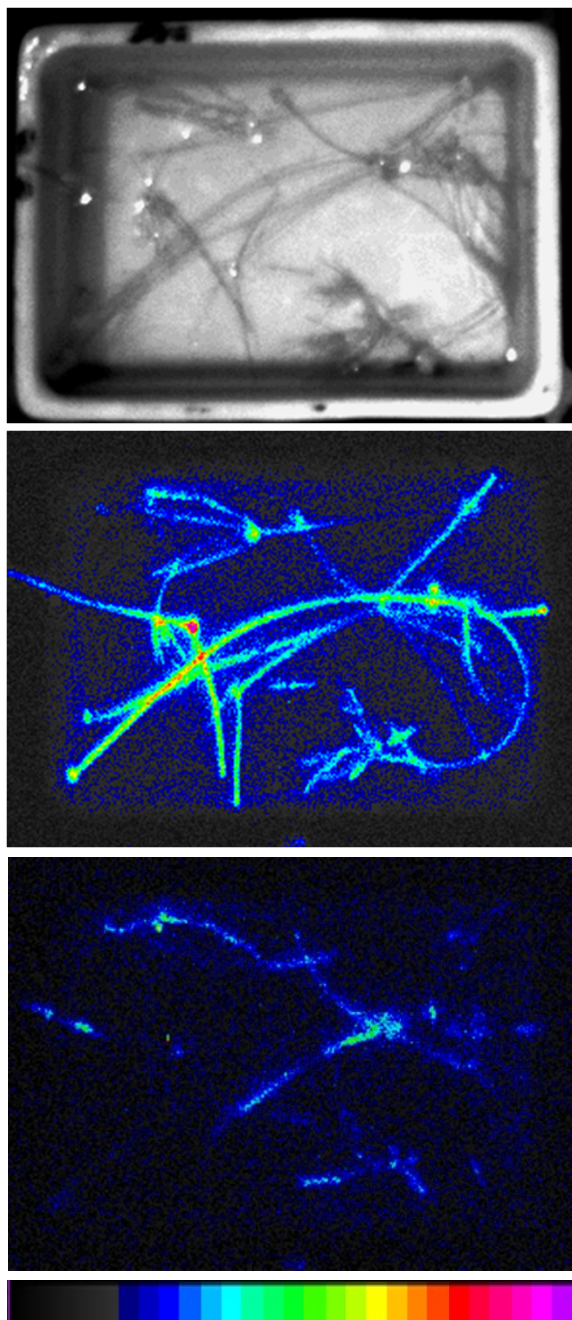


Rys. 5.2. Pomiary z rys. 5.1 przedstawione w logarytmicznym układzie współrzędnych: czerwone kółka – dane eksperymentalne; linia niebieska – krzywa teoretyczna typu podwójnej eksponenty; linia zielona – krzywa typu hiperboli. Wartości parametrów w równaniach krzywych teoretycznych:  $I_0=2599, A_1 = 126651, A_2 = 9567, \lambda_1 = 0,358, \lambda_2 = 0,044, i_0 = 2450, a = 282976, m = 1,424$

Krzywe przedstawione na rysunku 5.2 dopasowano komputerowo za pomocą programu „Statistica”. Dopasowanie typu hiperboli (krzywa zielona) jest mniej dokładne ( $R^2 = 0,9980$ ) niż dopasowanie dla podwójnej eksponenty (krzywa niebieska,  $R^2 = 0,9995$ ), dla której czasy połowicznego zaniku wynoszą odpowiednio:  $T_1 = 1,9$  min oraz  $T_2 = 15,8$  min. Parametry dopasowania  $R^2$  i  $\Sigma(I_{t_i} - Id_i)^2$  oraz czasy połowicznego zaniku  $T$  dla krzywych zawierających 1, 2 i 3 eksponenty przedstawiono w tabeli 5.1. Wynika z nich, że dopasowanie jedną eksponentą jest słabe, a trzema – prawie idealne.

Tabela 5.1. Parametry dopasowania  $R^2$  oraz sumy kwadratów odchylen krzywej teoretycznej od punktów doświadczalnych –  $\Sigma(I_{t_i} - Id_i)^2$  dla krzywych teoretycznych zawierających 1, 2 oraz 3 eksponenty wraz z odpowiadającymi im czasami połowicznego zaniku  $T$

Liczba eksponent	$R^2$	$\Sigma(I_{t_i} - Id_i)^2$	$T$ [min]
1	0,9580	$6370 \times 10^4$	3,9
2	0,9995	$68 \times 10^4$	1,9 15,8
3	0,9999	$0,015 \times 10^4$	1,7 8,1 26,4

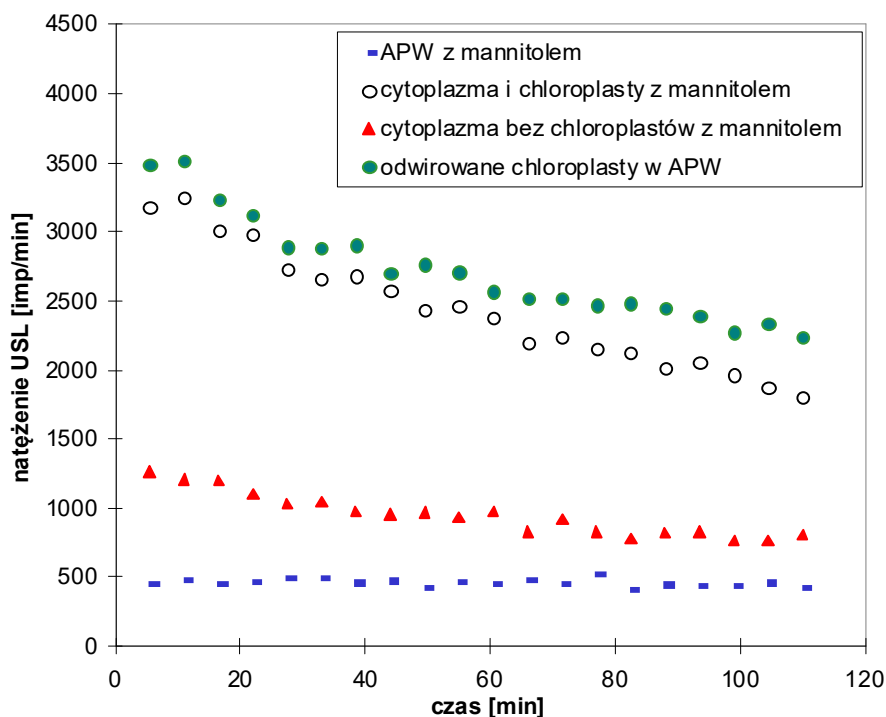


Rys. 5.3. Klasyczna fotografia w świetle odbitym oraz obrazy luminescencyjne komórek *Nitellopsis obtusa* uzyskane 5 minut i 10 godzin po wyciemnieniu. Czas akwizycji wynosił 5 min. Maksimum luminescencji na skali wynosi 5 zliczeń/piksel (120 zliczeń/mm<sup>2</sup>)

Można więc wnioskować, że dla przedziału czasowego od 5 minut do około 4 godzin obserwujemy przynajmniej dwa (raczej niezależne) procesy odpowiedzialne za wyświecanie, których czasy połowicznego zaniku wynoszą około 2 i 16 minut.

Warto zaprezentować zanik luminescencji, uzyskany za pomocą aparatury Molecular Light Imager, pozwalający otrzymać dwuwymiarowe obrazy próbek na różnym etapie wyświecania. Na rysunku 5.3 pokazano zestawione 3 obrazy tej samej próbki roślin. Górny jest fotografią czarnobiałą komórek *Nitellopsis obtusa* wykonaną na świetle zwykłym aparatem fotograficznym przed umieszczeniem próbki w komorze pomiarowej SPCI (rozdz. 3.3). Środkowy obraz przedstawia rośliny w fazie wyświecania luminescencji opóźnionej począwszy od 5 minuty po włożeniu próbki do komory światłoszczelnej, uzyskany z akwizycji sygnału wysyłanego przez rośliny w ciągu 10 minut. Trzeci, dolny obraz przedstawia rośliny emitujące ultrasłabą emisję fotonową po dziesięciu godzinach przechowywania ich w całkowitej ciemności. Warto zauważyć, że w sygnale uzyskanym metodą zliczania pojedynczych fotonów (SPC) pokazanym na rysunku 5.1 zawarta jest emisja fotonowa z całej próbki. Dopiero obrazy przestrzenno-czasowe tej emisji wyrażone przez natężenie USL jako funkcja  $f(x,y,t)$  odzwierciedla zmiany lokalne w każdym punkcie próbki oraz dynamikę tych zmian w czasie.

Przeprowadzone pomiary dla wyizolowanych z komórek Characeae frakcji zawierających cytoplazmę i chloroplasty, wykazały zdecydowanie bardziej długo-trwające wyświecanie dla próbek zawierających chloroplasty (rys. 5.4). Można z tego wnioskować, że za długotrwałe wyświecanie odpowiedzialny jest najprawdopodobniej chlorofil. Inne elementy cytoplazmy (w tym mitochondria) nie wpływają – jak się wydaje – znacząco na sumaryczną intensywność wyświecania z komórek i całych badanych organizmów.

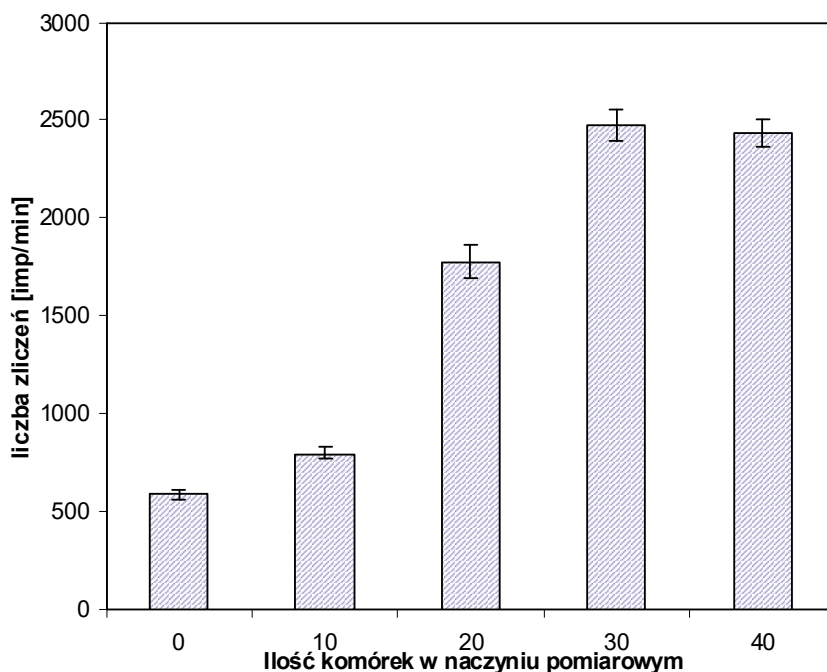


Rys. 5.4. Natężenie ultrasłabej luminescencji w funkcji czasu dla próbek: APW zawierającej cytoplazmę z chloroplastami (wyizolowaną z 40 komórek *Nitellopsis obtusa*), cytoplazmy po wyizolowaniu z niej chloroplastów, odwirowanych chloroplastów oraz kontrolnej próbki odniesienia zawierającej APW. Mannitol dodano w celu ochrony mitochondriów. Przed wyizolowaniem cytoplazmy komórki dodatkowo przetrzymywano przez 30 min w 0,35 M mannitolu. Pomiary rozpoczęto po 3,3 godz. od momentu umieszczenia próbek w światłoszczelnej komorze pomiarowej. Wszystkie próbki (oprócz samych chloroplastów) zawierały 0,3 M stężenie mannitolu

## 5.2. Luminescencja ultrasłaba (USL) – nieindukowana emisja fotonowa

### 5.2.1. Zależność intensywności USL od ilości komórek

Dla komórek *Nitellopsis obtusa* umieszczonych w światłoszczelnej komorze aparatury pomiarowej, emisja światła staje się stacjonarna po 3,5 do 6 i więcej godzinach od momentu wyciemnienia roślin. Sumaryczne natężenie tej emisji zależy od stanów funkcjonalnych badanych komórek oraz od ich ilości w próbce. Zależność liczby zliczeń fotonów USL od ilości komórek międzywęzłowych, umieszczonych w naczyniu pomiarowym, przedstawia rys. 5.5.



Rys. 5.5. Zależność intensywności USL (liczba zliczeń na jedną minutę) od ilości komórek międzywęzłowych w naczyniu pomiarowym (z 18 ml APW). Oznaczenia błędów są odchyleniami standardowymi z 10 punktów pomiarowych

Wykres reprezentuje przykładową, najbardziej typową serię pomiarową dla komórek zebranych z jeziora w końcu października (w 20 dni po zbiorze). Na wykresie można zauważyć niewielką różnicę w poziomie świecenia dla 30 i dla 40 komórek. Efekt stabilizowania się liczby zliczeń przy zwiększaniu ilości komórek w próbce, mógł być spowodowany wzajemnym pochłanianiem światła przez sąsiadujące ze sobą komórki.

Dla innych nie przedstawionych tutaj wyników serii pomiarowych, różnice te były również niewielkie. Z tego powodu przyjęcie liczby trzydziestu komórek międzywęzłowych w próbce uznano za optymalne.

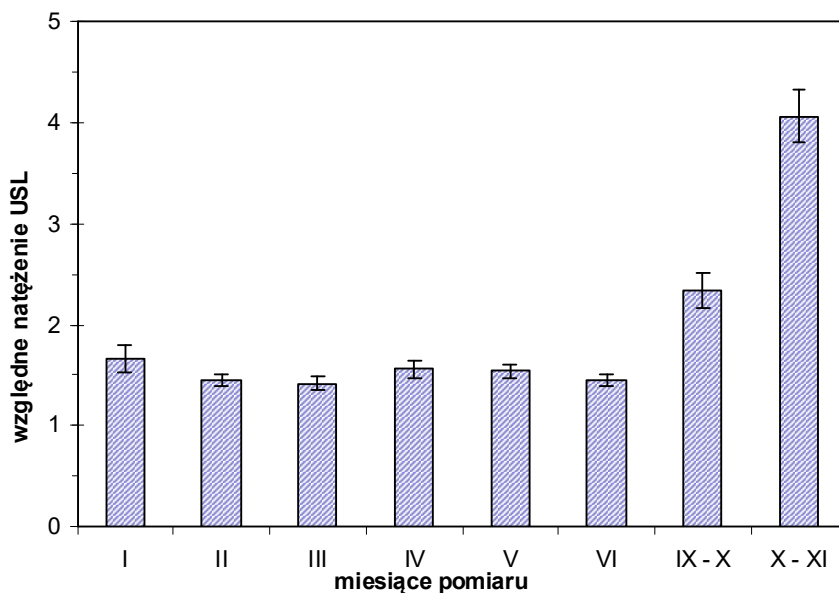
### 5.2.2. Zależność intensywności USL od okresu wegetacji

W zależności od okresu wegetacji zmieniają się różne parametry komórek Characeae, np.: opór elektryczny błony komórkowej oraz soku wakuolarnego (Skierczyńska i wsp. 1975), amplituda zmian oscylacyjnych oporu błony komórkowej (Śpiewła 1995), koncentracja jonów wakuolarnych (Winter i wsp. 1987, Beilby i wsp. 1999), transport międzykomórkowy (Shepherd i Goodwin

1992), potencjał czynnościowy indukowany D<sub>2</sub>O i szybkość cyrkulacji strumienia protoplazmy (Andjus i wsp. 1997), długość komórek i ich biomasa (Nichols i wsp. 1986, Fernández-Aláez i wsp. 2002).

W związku ze zmianami różnych parametrów komórek w zależności od wegetacji, przeprowadzono także pomiary USL uwzględniając porę roku oraz czas od momentu zbioru roślin. Okazało się, że także intensywność spontanicznego ultrasłabego świecenia zależy w dużym stopniu od pory roku, a więc od okresu wegetacji osobniczej. W okresie zimowym i wiosennym rośliny hodowane w akwariach „świecą” najslabiej, zaś świeżo przywiezione z jeziora o wiele silniej w porównaniu z hodowanymi laboratoryjnie. W okresie jesiennym intensywność świecenia jest największa.

Wyniki pomiarów intensywności USL komórek *Nitellopsis obtusa* w zależności od pory roku, przedstawione zostały na rysunku 5.6. Zawiera on względne (względem świecenia samego APW), uśrednione wartości natężenia ultrasłabej luminescencji, uzyskane w poszczególnych miesiącach roku, dla roślin zebranych jesienią roku poprzedniego (pomiary od stycznia do czerwca) oraz dla roślin zebranych 03.IX i 08.X roku, w którym wykonano pomiary (odpowiednio dla miesięcy: IX–X i X–XI). Pomiary jesienne były przeprowadzane 20 dni po



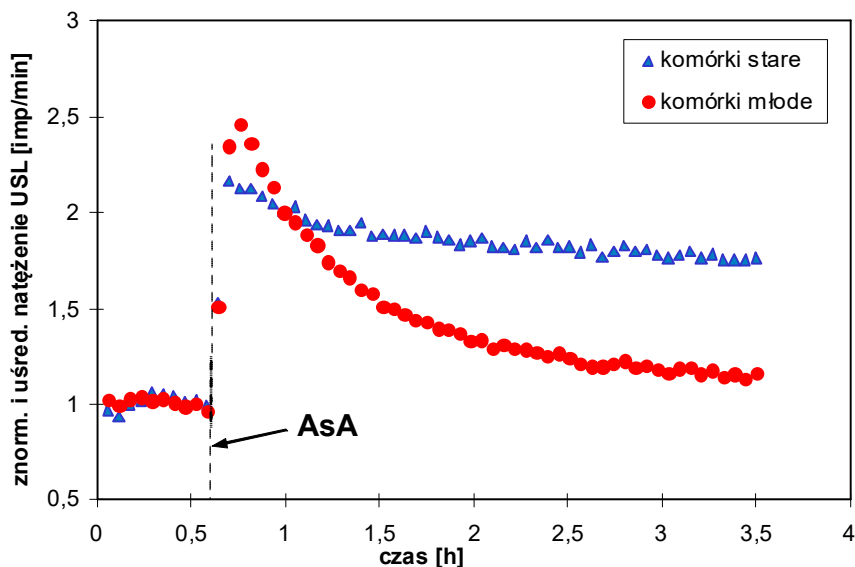
Rys. 5.6. Względne natężenie USL (komórki / APW) otrzymane w różnych porach roku. Zaznaczone błędy są średnimi błędami standardowymi (licząc od lewej): 10, 13, 13, 15, 11, 17, 16, 15 punktów pomiarowych (każdy punkt pomiarowy stanowi średnią z 60 pomiarów jednonminutowych)



zbiorze (po okresie aklimatyzacji roślin do warunków laboratoryjnych – patrz rys. 5.9). Widać wyraźnie, że w okresie jesiennym komórki glonów Characeae wykazują wyraźną tendencję do wzmożonej ultrasłabej emisji.

Intensywniejsze ultrasłabe światlenie w okresie jesiennym, może być spowodowane wzmożeniem procesów metabolicznych w komórkach, związane z tym, że rośliny w okresie od połowy lata do późnej jesieni wytwarzają organy rozmnażania płciowego tj. lęgnie i plemniki. Zjawisko to może być również związane z procesami starzenia się roślin oraz towarzyszącej temu większej zawartości wolnych rodników i równocześnie mniejszej zawartości inhibitorów reakcji wolnorodnikowych, może więc wystąpić bardziej intensywny proces peroksydacji lipidów błon komórkowych.

Stwierdzono, że komórki z okresu jesiennego wykazują większą tendencję do generowania rytmicznych zmian USL i zmiany te mają charakter mniej lub bardziej regularnych oscylacji (zagadnienie to jest omówione w dalszej części pracy). Okazuje się, iż reakcje komórek na różne reagenty – np. kwas askorbinowy, również są uzależnione od okresu wegetacji (Jaśkowska i wsp. 1999). Na rysunku 5.7 zaprezentowano dwa przebiegi USL otrzymane po zadaniu kwasu



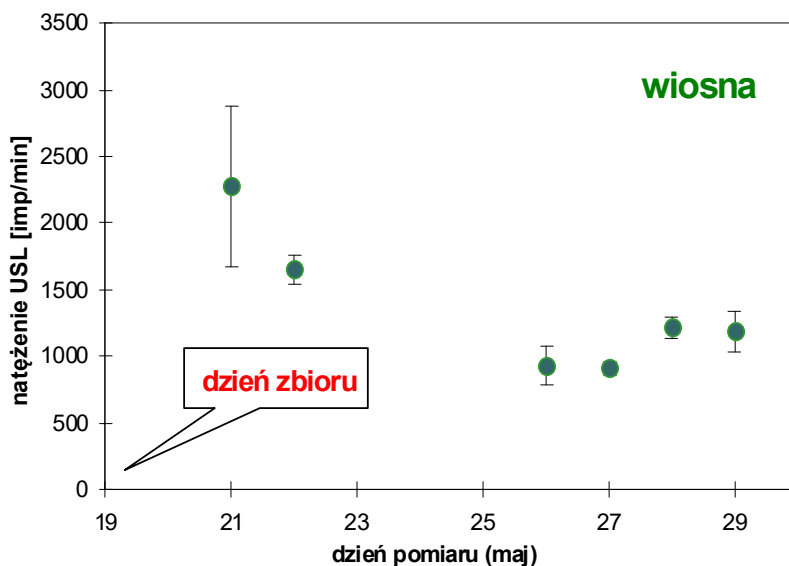
Rys. 5.7. Ultrasłaba emisja komórek glonów *Nitellopsis obtusa* – starych i młodych (objaśnienia w tekście), po ekspozycji na działanie 5mM kwasu askorbinowego (AsA). Normalizację krzywych przeprowadzono dzieląc wartości pomiarów USL przez uśrednioną wartość pomiarów przed dodaniem reagenta. Wyniki uśredniono z sześciu serii pomiarowych. Średnie błędy standardowe z wszystkich pomiarów po zadaniu AsA wynosiły odpowiednio  $\pm 0,18$  dla komórek starych i  $\pm 0,15$  dla młodych (błędy dla pojedynczych punktów pomiarowych nie różniły się od siebie znacząco)

askorbinowego (AsA) do APW (5 mM/L), w którym znajdowały się komórki *Nitellopsis obtusa* (rośliny zebrano i mierzono w maju). Przebadano dwa rodzaje komórek, zasadniczo różniących się od siebie. Jeden rodzaj to komórki młode, a więc niewielkie i jaskrawo-zielone, wyrosłe świeżo na wiosnę. Natomiast drugi rodzaj, to komórki stare, duże, o barwie brunatno-zielonej, które przetrwały zimę, będąc komórkami wieloletnimi.

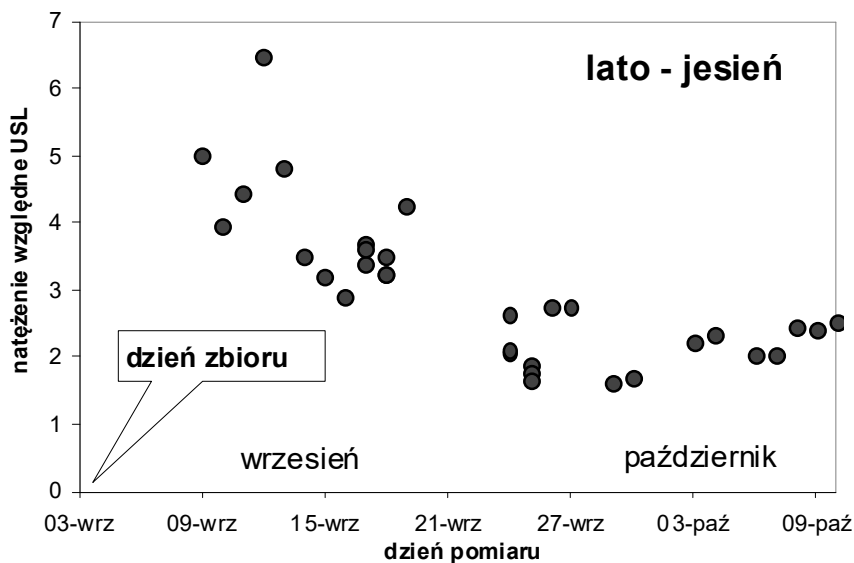
Kształt krzywej natężenia USL komórek młodych wskazuje na większą dynamiczność ich zachowań aniżeli komórek starych (nieco większy wzrost oraz gwałtowniejszy spadek). Gwałtowniejszy spadek może być związany z szybszą inhibicją procesów odpowiedzialnych za reakcje wolnorodnikowe (komórki młode szybciej „radzą sobie” z zaburzeniami wywołanymi kwasem askorbinowym). Szerszy opis procesów oddziaływania AsA na komórki Characeae oraz ich frakcje przedstawiono w rozdziale 6.1.

Poziom USL zależy także od przedziału czasu pomiędzy umieszczeniem roślin w akwariu, a momentem pomiaru czyli od okresu adaptacji roślin do warunków laboratoryjnych (Jaśkowska i wsp. 1999).

Pomiary przeprowadzono dla roślin zebranych w maju (rys. 5.8) oraz we wrześniu (rys. 5.9). Dzień zbioru był jednocześnie dniem umieszczenia roślin w akwariach, w warunkach laboratoryjnych.



Rys. 5.8. Zależność intensywności USL od daty jej pomiaru dla komórek *Nitellopsis obtusa*, zebranych z jeziora 19 maja. Zaznaczono średnie błędy standardowe dla czterech próbek, dla których wykonano po 60 jednonminutowych pomiarów



Rys. 5.9. Zależność natężenia względnego USL (względem natężenia samego APW) od daty pomiaru dla komórek *Nitellopsis obtusa* zebranych z jeziora 03 września. Jeden punkt stanowi średnią z jednej serii pomiarowej, obejmującej 60 jednonminutowych pomiarów

Jak widać, w obydwu przypadkach intensywność spontanicznej USL staje się coraz mniejsza w miarę upływu czasu licząc od dnia, w którym nastąpił zbiór roślin. W pokazanym przykładzie stabilizacja poziomu USL dla roślin wiosennych następuje po około sześciu dniach od momentu zbioru, natomiast dla roślin letnio-jesiennych po około dwudziestu dniach. Obserwowane zjawisko obniżania się intensywności USL dowodzi – jak się wydaje – stopniowej aklimatyzacji roślin do warunków laboratoryjnych. Aklimatyzacja może oznaczać dostosowanie się roślin do zmian temperatury (wyższa temperatura w akwarium), oświetlenia oraz ciśnienia (mniejsza głębokość). Wzmoczone światło roślin może być także związane z szokiem spowodowanym urazami mechanicznymi, powstałymi w wyniku wydobycia z jeziora, transportu oraz oczyszczania roślin. Porównując obydwie wykresy możemy stwierdzić, że rośliny z okresu wiosennego szybciej przystosowują się do odmiennych (stresowych) warunków otoczenia niż rośliny z okresu letnio-jesiennego. Może to oznaczać, iż właśnie rośliny młode są bardziej odporne na zmiany czynników zewnętrznych, przez co ich możliwości przystosowania i przeżycia są większe.

### 5.2.3. Oscylacyjny charakter USL

Występowanie procesów oscylacyjnych w żywych organizmach roślinnych (Sweeney 1987) stwierdza się na różnych poziomach organizacji, są one różnorodne i ciągle dość słabo rozpoznane. W komórkach Characeae już dość dawno stwierdzono występowanie oscylacji parametrów elektrycznych, np.: potencjału błonowego (Śpiewła 1979, Toko i wsp. 1988, Śpiewła i Tokarska 1990), wiążanego niesłusznie z cyrkulacją cytoplazmy (Ogata i Kishimoto 1976), przewodnictwa elektrycznego błon (Śpiewła 1994) i złączy międzykomórkowych (Tokarska i Śpiewła 1993) oraz wewnątrzkomórkowego pH (Fisahn i wsp. 1986). Badano zależność amplitudy oscylacyjnych zmian parametrów elektrycznych od etapu rozwoju komórek *Nitellopsis obtusa* (Śpiewła 1995) oraz zmian czynników środowiska roślin (Śpiewła 1994). Oscylacje potencjału obserwowano także na błonach modelowych (Yoshikawa i wsp. 1988).

Usa i wsp. (1990) stwierdzili okresowe zmiany intensywności ultrasłabej luminescencji, stowarzyszone ze spontanicznym powierzchniowym potencjałem elektrycznym, dla rozwijającego się korzenia (wraz z hipokotylem) soi.

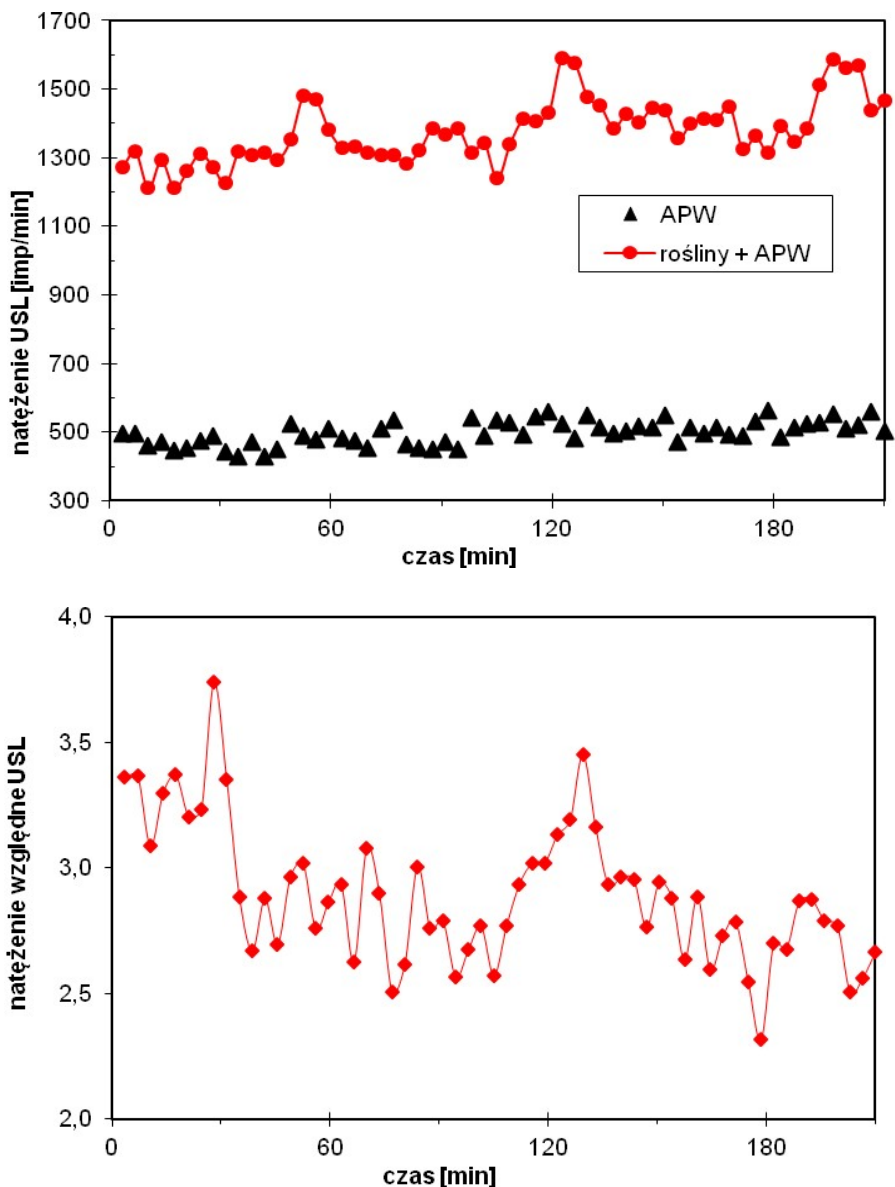
Istnieje niewiele prac dotyczących procesów oscylacyjnych ultrasłabej spontanicznej luminescencji organizmów roślinnych. Zaobserwowano jednakże zmiany USL w szerokim zakresie okresowości, np.: w cyklu dobowym dla korzenia grochu (Sul'tsman i wsp. 1976) i siewek pszenicy (Moraes i wsp. 2012) czy też w cyklu nakładających się na siebie oscylacji o okresie kilku minut oraz sekund dla komórek glonów *Acetabularia acetabulum* (Van Wijk. i Van Wijk. 2003).

Procesy oscylacyjne ultrasłabej chemiluminescencji wykryto także w wielu roztworach (Voeikov i wsp. 2001) np. glicyny z rybozą w obecności różnych substratów (Koldunov i wsp. 2000). Takie procesy mogą towarzyszyć fotooddychaniu czyli chlororespiracji (u Zielenic).

Zauważono, że procesy, w których uczestniczą reaktywne formy tlenu dążą do „samoorganizacji”, a ujawnia się to poprzez ciągle oscylacje chemiluminescencji, także wówczas, kiedy procesy te są katalizowane przez enzymy, takie jak peroksydaza (Kummer i wsp. 1996).

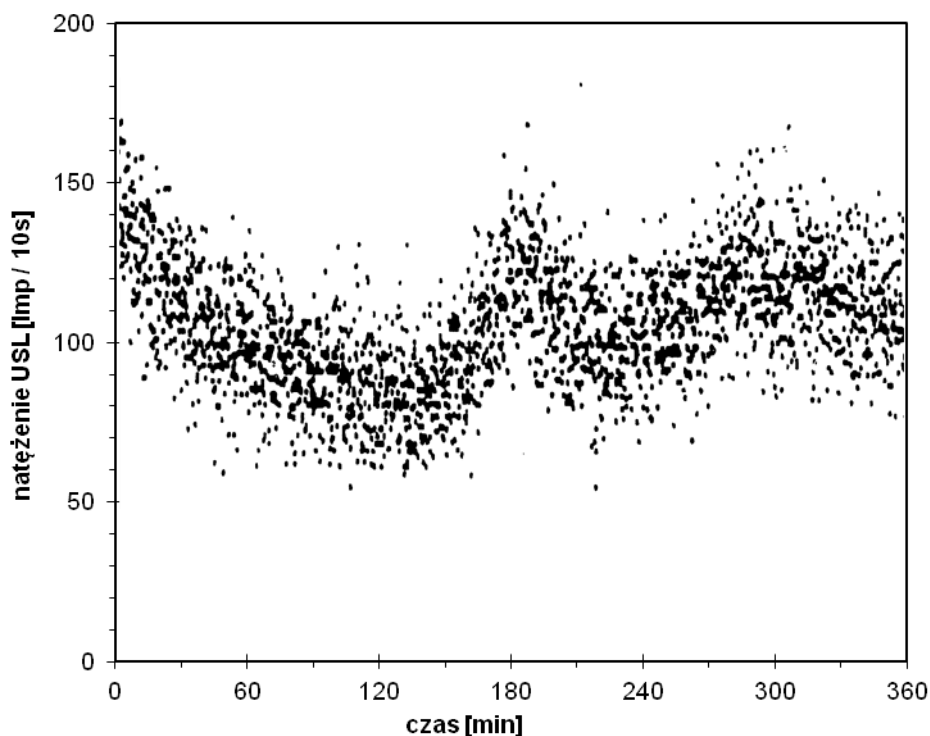
W związku z występowaniem procesów oscylacyjnych pewnych parametrów (głównie elektrycznych) u komórek Characeae, poddano szczegółowej analizie ultrasłabe świecenie komórek *Nitellopsis obtusa* i stwierdzono, że u pewnej liczby próbek stacjonarność spontanicznej USL ulegała pewnym zaburzeniom, a zaburzenia te miały charakter oscylacyjny (Jaśkowska i wsp. 1999, 2001a). Na podstawie przebadanych ponad 100 próbek, zawierających po 30 komórek międzywęzłowych oddzielnych fragmentów roślin, można stwierdzić, że co najmniej 10 % próbek wykazywało charakter oscylacyjny USL. Przykładowe wyniki dwóch takich pomiarów przedstawione zostały na rys. 5.10. Ze względu na niewielki czas trwania pomiaru (w porównaniu do czasu trwania pełnego

cyklu oscylacji) nie można było przeprowadzić analizy statystycznej. Jednakże na podstawie danych z rysunków można stwierdzić, że okres obserwowanych oscylacji zawiera się w przedziale od 1 do 2 godzin.



Rys. 5.10. Przykłady zmian oscylacyjnych USL dla próbek zawierających 30 komórek glonów *Nitellopsis obtusa*

Podjęto próby wykrycia oscylacji USL w pojedynczych fragmentach roślin. Ze względu na niski poziom USL z pojedynczych fragmentów roślin, do badań tych brane były komórki, o jak największym emitowanym sygnale. Dlatego też pomiary wykonywano bezpośrednio po zbiorze roślin. Na 10 wziętych do pomiaru próbek (fragmentów roślin, zawierających 2 lub 3 młode komórki międzywęzłowe), tylko u jednej zaobserwowano wyraźny oscylacyjny charakter zmian USL, co pokazano na rysunku 5.11. Przedstawiony wynik otrzymano dla próbki zawierającej pojedynczy fragment szczytowej części rośliny, zbudowany z dwu komórek międzywęzłowych z nibyliściami. Pomiaru tego dokonano w czerwcu, następnego dnia po zbiorze, około 4 godziny po wyciemnieniu.



Rys. 5.11. Oscylacyjne zmiany ultrasłabej luminescencji ze szczytowej części rośliny *Nitellopsis obtusa* zawierającej dwie komórki międzywęzłowe z nibyliściami (po odjęciu tła APW)

Obserwowane oscylacyjne zmiany USL dowodzą – jak przypuszczamy – występowania rytmicznych zmian metabolizmu badanych komórek. Jest bardzo prawdopodobne, że może mieć to bezpośredni związek z procesami oddychania. Za hipotezą tą przemawiają badania Edmunda (1988), który stwierdził, że u tych roślin występuje charakter oscylacyjny procesów oddychania.

Usa i współpracownicy (1990) zaobserwowali korelacje pomiędzy zmianami oscylacyjnymi USL korzenia soi, a oscylacjami parametrów elektrycznych błon komórek tych korzeni. Badania te mogą świadczyć o tym, że przyczyna generowania USL jest bezpośrednio powiązana ze zmianami elektrycznymi błony. Oczywiście powiązanie to może mieć także charakter pośredni; mianowicie zmiany elektryczne błony poprzez transport jonowy, mogą wpływać na zmiany metabolizmu komórkowego, a te z kolei są przyczyną zmian intensywności USL. Za tą drugą koncepcją przemawiają wyniki pomiarów USL dla Characeae eksponowanych na działanie anestetyków lokalnych (zmiany intensywności USL nie mają bezpośredniego odzwierciedlenia w zmianach parametrów elektrycznych – patrz rozdz. 7.2) oraz fakt, że dla komórek roślin Characeae trudno jest dopatrzeć się prostych podobieństw okresów oscylacji natężenia USL z oscylacjami wartości parametrów elektrycznych.

Otrzymywanie przebiegów oscylacyjnych w próbkach zawierających po 30 niepołączonych ze sobą komórek międzywęzłowych oraz w próbkach zawierających od 15 do 20 fragmentów roślin złożonych z 1 lub 2 komórek, może wskazywać na sprzężenie pewnych parametrów odpowiedzialnych za oscylacje, a co za tym idzie – za pewną komunikację między poszczególnymi, samodzielnie funkcjonującymi komórkami i fragmentami rośliny.

Komunikacja taka mogłaby mieć charakter oddziaływań elektrycznych, chemicznych lub fotonowych. Za trzecim typem komunikacji przemawiają liczne eksperymenty z ultrasłabą luminescencją, zapoczątkowane przez Gurwicza i kontynuowane dalej – głównie przez uczonych rosyjskich i niemieckich (patrz rozdz. 1). Tematykę dotyczącą synchronizacji elektromagnetycznych oddziaływań międzykomórkowych podejmowano między innymi w pracach: Breithaupt (1977), Strogatz i Stewart (1993), oraz Cifra i wsp. (2011).

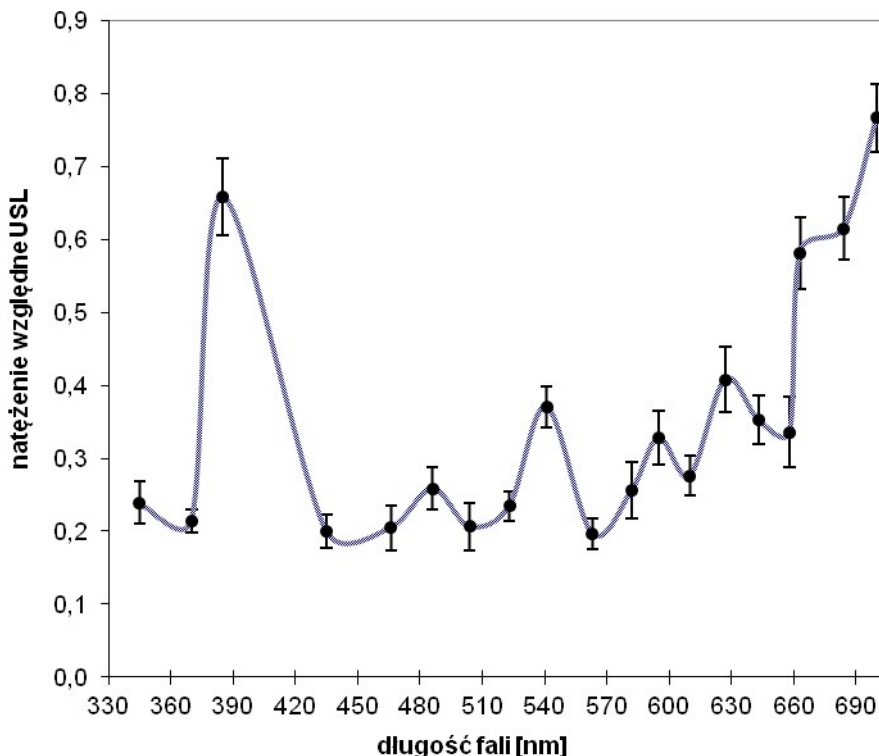
#### **5.2.4. Rozkład spektralny USL**

Analiza spektralna spontanicznej emisji fotonowej z obiektów biologicznych może dostarczyć ważnych informacji dotyczących źródeł tej emisji, jak również stanu fizjologicznego w jakim dany obiekt się znajduje (Chwirot 1998).

W badaniach rozkładu spektralnego USL roślin (Abeles 1986, Sławińska 1990) istotne jest czy podczas pomiarów mamy do czynienia z intensywnym wzrostem, podczas którego dochodzi do licznych podziałów komórkowych (Sławiński i wsp. 1981) oraz czy badany obiekt zawiera chloroplasty bardzo istotnie wpływające na rozkład spektralny (Hideg i wsp. 1990, Tang i wsp. 1999). Aby uwolnić się od luminescencji chlorofilu, często stosowanym materiałem badanym są systemy korzenne (Ichimura i wsp. 1989) lub rośliny etiolowane (Mandoli i Briggs 1982).

W przedstawianych w niniejszej pracy badaniach zastosowano zaadaptowane do ciemności komórki *Nitellopsis obtusa*, dla których określano rozkład spektralny spontanicznej luminescencji w zakresie około 320–720 nm (Jaśkowska

i wsp. 2001b), stosując metodę opartą na filtrach granicznych (rozdz. 3.2). Przedstawione na rysunku 5.12 wyniki stanowią rezultat uśrednienia 26 serii pomiarowych wykonanych w ciągu wielu miesięcy, w różnych porach roku. Aby dokonać interpretacji rozkładu spektralnego USL, można się posłużyć wykresem przedstawionym na rysunku 2.1, na którym na osi obrazującej długości fal elektromagnetycznych zaznaczone zostały ważniejsze emitery USL.



Rys. 5.12. Rozkład spektralny względnego natężenia spontanicznej USL komórek *Nitellopsis obtusa*. Każdy punkt pomiarowy stanowi średnią z 26 serii, zaznaczono średnie błędy standardowe. Normalizację przeprowadzono niezależnie w każdej serii pomiarowej przyjmując, że przedziałowi o szerokości  $\Delta\lambda$  w którym natężenie emisji jest największe odpowiada względne natężenie USL równe jeden

Rozpoczynając analizę od wysokoenergetycznej części widma, t.j. od strony fal krótkich, obserwuje się duże „maksimum” dla fali o długości około 385 nm. Za tę długość fali odpowiedzialne są najprawdopodobniej dimole tlenu singletowego  $2O_2(^1\Sigma_g^+)$ , powracające na poziom podstawowy – trypletowy  $2O_2(^3\Sigma_g^-)$  i emitujące przy tym falę o długości około 382 nm. Niewielkie



maksimum występujące dla fali o długości ok. 485 nm może być związane z dimolami  $O_2(^1\Sigma_g, ^1\Delta_g)$ , odpowiedzialnymi za emisję fali o długości 478 nm. Maksimum odpowiadające długości fali 540 nm może być związane z fluorescencją FMN (Nishimura i Tsuboi 1978).

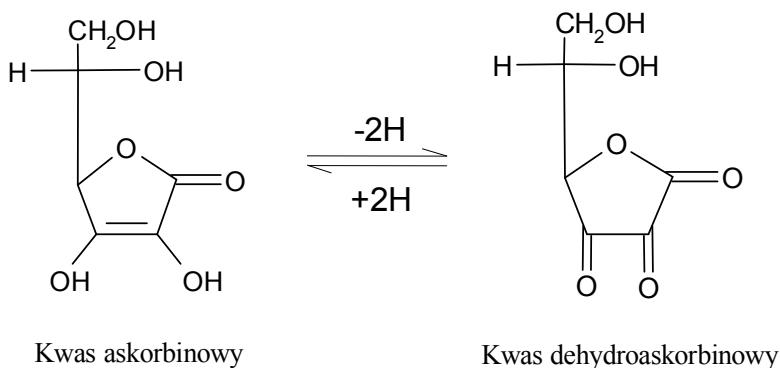
Należy podkreślić, że za emisję w obszarze fal o długości 450–610 nm mogą odpowiadać również inne przenośniki elektronów w łańcuchu oddechowym NADH:  $Q_{10}$  oraz cytochromy (Milczarek i wsp. 1994). Za emisję w omawianej części widma, a ściślej w przedziale długości fal około 350–540 nm, odpowiadają także wzbudzone grupy karbonylowe (Cadenas 1984, Federova i wsp. 2007), bardzo istotne emitery USL. Idąc dalej w stronę fal dłuższych widać dość intensywną emisję, występującą przy długości fali około 630 nm, związaną – jak się przypuszcza – z występowaniem dimoli tlenu singletowego  $2O_2(^1\Delta_g)$  odpowiedzialnych za emisję fali o długości 634 nm. Maksimum obserwowane przy długości około 700 nm odpowiada położeniu fali (703 nm) dla dimoli  $2O_2(^1\Delta_g)$ , powracających na pierwszy poziom wibracyjny stanu podstawowego. Większa intensywność emisji w całej czerwonej części widma, t.j. od około 660 nm – wiąże się najprawdopodobniej z przedziałem emisyjnym chloroplastów (maks. przy około 685 nm) (Hideg i wsp. 1989). Emisja własna chlorofilu roślin przetrzymywanych przez kilkanaście godzin w kompletnym zaciemnieniu, może być związana z fluorescencją zabsorbowanej części energii z wysoko energetycznych obszarów widma, np. z grup karbonylowych  $^3(=C=O)$  (De Mello i wsp. 1988).

Występowanie tlenu singletowego, jak też wzbudzonych grup karbonylowych – może mieć związek z utlenianiem nienasyconych kwasów tłuszczowych (peroksydacją lipidów) w lipidach błon strukturalnych komórki (Miyamoto i wsp. 2014).

## 6. Zmiany ultrasłabej emisji fotonowej wywołane przez antyoksydanty

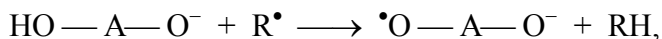
### 6.1. Wpływ kwasu askorbinowego

Kwas askorbinowy (AsA) zwany także askorbinianem lub witaminą C (wzór strukturalny podano na rysunku 6.1) jest bardzo ważnym antyoksydantem hydrofilowym. Stosowany jest on w ochronie organizmu przed wolnorodnikowymi uszkodzeniami komórek w wyniku chorób lub innych szkodliwych czynników (np. promieniowania). Antyoksydacyjność AsA wynika z jego silnych własności redukcyjnych. Będące produktami metabolizy komórkowej reaktywne formy tlenu (np. tlenu singletowego) i azotu są przez ten bioczynnik neutralizowane. W komórkach roślinnych występuje w apoplacie, cytozolu, plastydach i wakuoli, pełniąc ważną funkcję ochronną oraz regulacyjną w różnicowaniu, wzroście i metabolizmie (Smirnoff i Wheeler 2000). Kwas askorbinowy może być akceptorem wolnych rodników w reakcjach niekatalizowanych lub katalizowanych przez enzymy, chroniąc chloroplasty przed reaktywnymi formami tlenu (cykl Halliwella-Asady – Bowler i wsp. 1992). Askorbinian dostaje się do komórki na zasadzie dyfuzji ułatwionej, głównie w formie utlenionej jako dehydroaskorbinian (rys. 6.1).



Rys. 6.1. Wzory strukturalne kwasu askorbinowego i dehydroaskorbinowego

W roztworach wodnych kwas askorbinowy (HO — A — OH) jest najczęściej prawie całkowicie zdysocjowany i występuje w postaci jednowartościowego anionu askorbinowego: HO — A — O<sup>-</sup>. Wykazuje on silne właściwości redukcyjne wobec wolnych rodników np. LOO<sup>•</sup>, zapobiegając ich oksydacyjnej aktywności, a więc jest tzw „zmiataczem” wolnych rodników. Można to zapisać następująco:

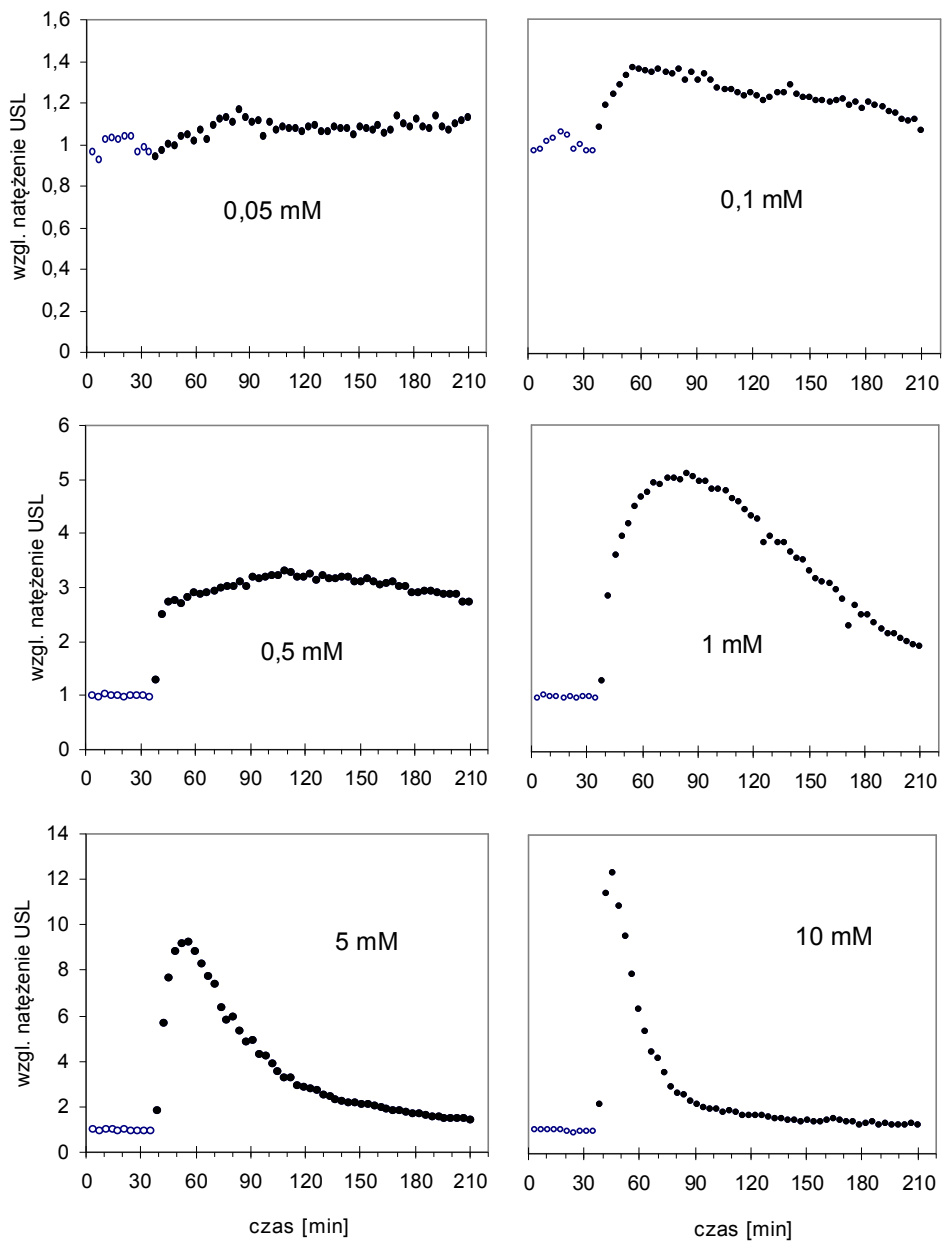


gdzie  $\text{R}^\bullet$  oznacza wolny rodnik, natomiast  $\bullet\text{O} - \text{A} - \text{O}^-$  jest stosunkowo mało reaktywnym rodnikiem askorbinowym. W procesie autoutleniania do formy dehydroaskorbinianu, askorbinian występuje także w innych formach pośrednich (Bors i Buettner 1997).

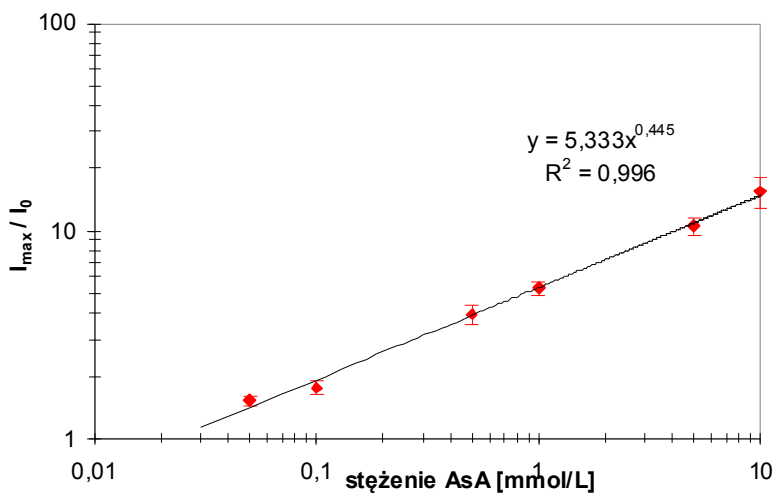
Do przeprowadzenia badań USL komórek Characeae traktowanych kwasem askorbinowym skłaniają przynajmniej trzy czynniki: 1) właściwość kwasu askorbinowego powodująca zmiatanie wolnych rodników, 2) ultrasłaba luminescencja objawiająca się jako skutek reakcji wolnorodnikowych, 3) hydrofilowy charakter AsA. Z tego powodu przeprowadzono szereg eksperymentów mających za zadanie wyjaśnienie oddziaływanie tego bioczyownika z badanymi komórkami.

W prezentowanych badaniach AsA podawany był do środowiska APW, w którym znajdowały się komórki Characeae, do uzyskania stężenia końcowego: 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1; 5; 10 mM/L. Wykonano szereg pomiarów intensywności USL, a najbardziej typowe wyniki dla poszczególnych stężeń przedstawiono na rysunku 6.2 (pominięto stężenie 0,01 mM ze względu na niezauważalne zmiany). Analiza kinetyki zmian intensywności USL pozwala stwierdzić, że zaraz po podaniu AsA następował wzrost świecenia – tym większy i gwałtowniejszy, im wyższe było stężenie substancji czynnej (rys 6.3 i 6.4). Po początkowym wzroście następował stopniowy jego spadek – tym szybszy, im większe było stężenie AsA. Wzrost natężenia USL pozwala przypuszczać, że AsA w przeprowadzonych eksperymentach może wykazywać prooksydacyjny charakter oddziaływania, a nie – jak się powszechnie przyjmuje – antyoksydacyjny.

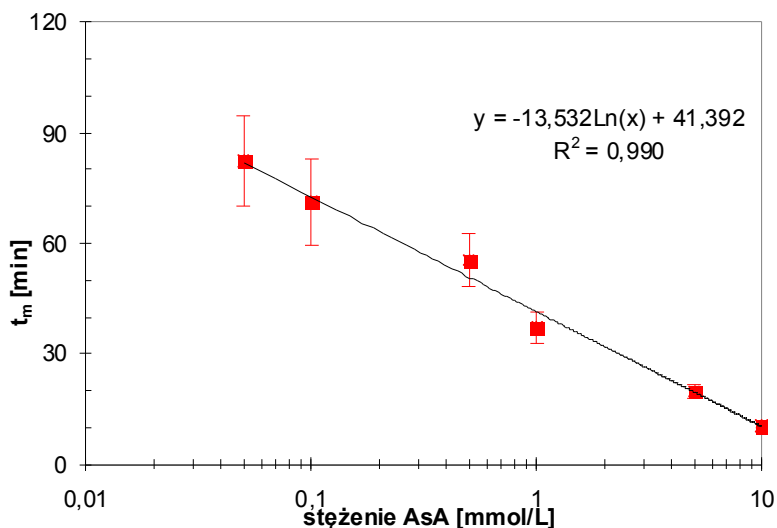
Wyniki te zostały potwierdzone przez obrazowanie luminescencyjne przedstawione dla próbki poddanej działaniu kwasu askorbinowego o najwyższym stężeniu, tj. 10 mM (rys. 6.5). Pierwszy obraz roślin (A) pokazuje fotoindukowaną emisję fotonową dla próbki. Obraz (B) przedstawia wyświecanie próbki po 10 minutach od podania reagenta. Następne C) i D) obrazy luminescencyjne przedstawiają emisję fotonową indukowaną AsA odpowiednio po 70 i 190 minutach. Interesującym jest fakt, że obrazowanie luminescencyjne ujawnia osobnicze właściwości poszczególnych komórek ponieważ jak widać, świecą one niejednocześnie, a raczej sukcesywnie jedna, a następnie inna, tak jakby miały każda z nich inną wrażliwość na działanie AsA. Ponadto w obrębie pojedynczej komórki emisja fotonowa jest nierównomierna i poszczególne jej części wykazują zmienne w czasie natężenie USL. Godne podkreślenia jest to, że po eksperymencie wszystkie komórki wykazywały dobrą kondycję, co się objawiało tym, że szybkość ruchu cytoplazmy powracała do wartości wyjściowej sprzed podania AsA oraz tym, że wszystkie komórki zachowywały odpowiednią sprężystość (turgor). Uzyskany obraz luminescencyjny wykazuje korelację z wynikami USL zaprezentowanymi na rysunku 6.2.



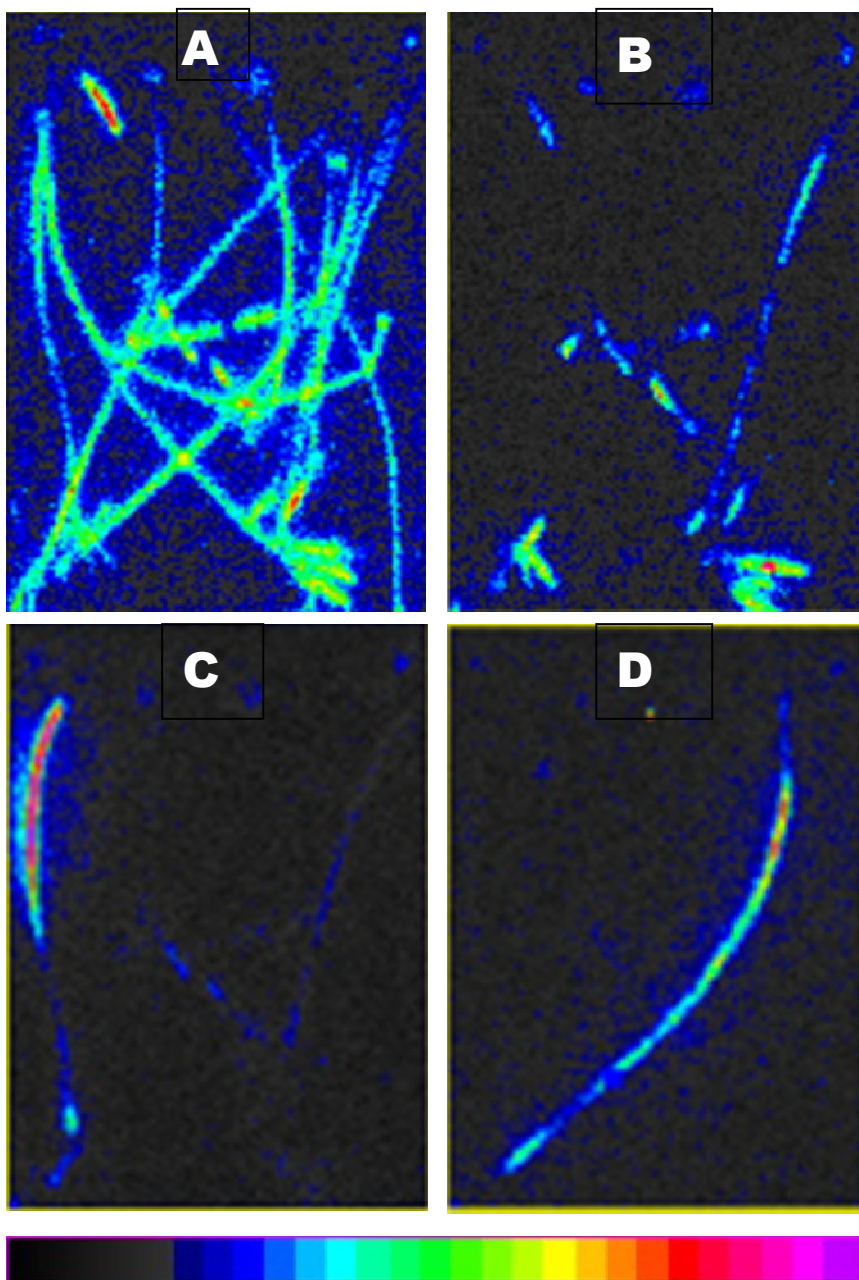
Rys. 6.2. Względne natężenie USL komórek *Nitellopsis obtusa* eksponowanych na działanie kwasu askorbinowego: kółka puste – przed zadaniem AsA, kółka pełne – po zadaniu AsA. Poszczególne wykresy prezentują wyniki najbardziej typowych pojedynczych pomiarów, wybranych z dziesięciu serii. Wartości względne natężeń USL uzyskano dzieląc otrzymane wyniki przez uśrednioną wartość, odpowiadającą początkowym punktom pomiarowym – bez AsA



Rys. 6.3. Względne natężenie USL ( $I_{max}/I_0$ ) odpowiadające wartościom maksymalnym w zależności od stężenia AsA w APW z komórkami Characeae. Oś przedstawiona są w skali logarytmicznej. Zaznaczono odchylenia standardowe z 10 serii pomiarowych. (Jaśkowska i wsp. 2001a – rysunek zmodyfikowany)

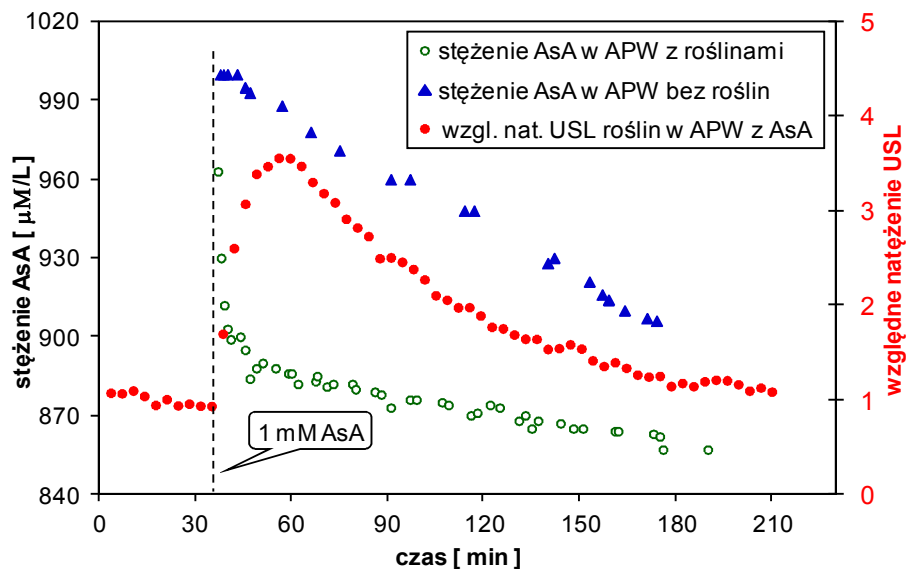


Rys. 6.4. Czas ( $t_m$ ), po którym występowało maksimum intensywności USL, w zależności od zadanego stężenia AsA, w APW z komórkami Characeae. Oś stężeń przedstawiona jest w skali logarytmicznej. Zaznaczono odchylenia standardowe z 10 serii pomiarowych. (Jaśkowska i wsp. 2001a – rysunek zmodyfikowany)



Rys. 6.5. Obraz fotoindukowanej luminescencji komórek *Nitellopsis obtusa* (A) oraz obrazy luminescencyjne tych komórek po wyciemnieniu i poddanych działaniu 10 mM kwasu askorbinowego, uzyskane odpowiednio: B) – 10 minut, C) – 70 minut i D) – 190 minut od początku ekspozycji. Czas akwizycji wynosił 10 min. Maksimum luminescencji na skali wynosi 45 zliczeń/piksel (400 zliczeń/ $\text{mm}^2$ )

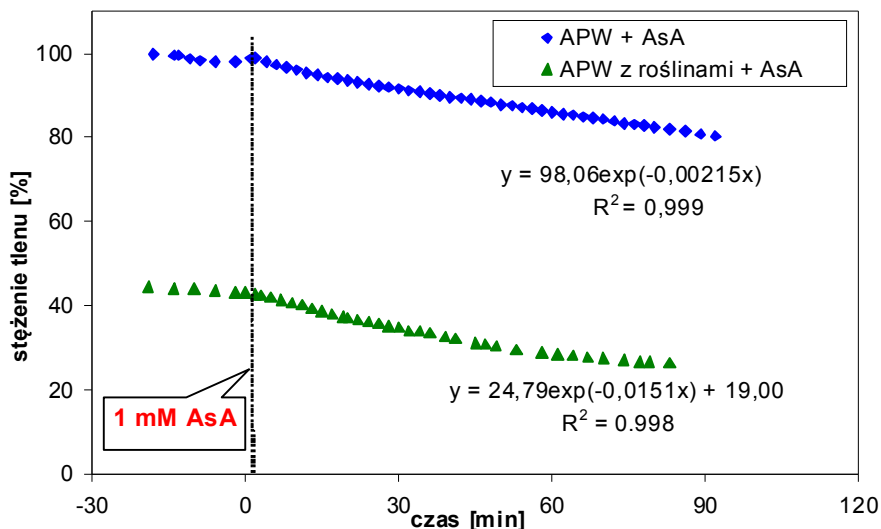
Badania spektroskopowe wykazały, że AsA występował w roztworze APW w formie jednoujemnego anionu askorbinowego, dla którego maksymalna absorpcja występuje przy długości fali 265 nm. Mierząc absorbancję dla AsA w środowisku z APW i badanymi roślinami, stwierdzano gwałtowny spadek stężenia AsA w pierwszych minutach (rys. 6.6). W tym samym czasie następował szybki wzrost intensywności USL – do wartości maksymalnej. Po tym etapie zmian, pojawiał się spadek stężenia askorbinianu w środowisku APW z badanymi komórkami, wyraźnie jednak mniejszy od tego, jaki obserwowano w środowisku kontrolnym – z samym APW. Otrzymane rezultaty można wytłumaczyć tym, że bez światła (pomiar przeprowadzono w zaciemnionym pomieszczeniu, z dostępem światła poniżej 3 lux) – proces fotosyntezy ustaje, a rośliny pobierają tlen ze środowiska. Mniejsza zawartość tlenu w środowisku powoduje wolniejszy rozkład AsA (wolniejsze utlenianie).



Rys. 6.6. Stężenie AsA w APW z roślinami Characeae i bez roślin, po ekspozycji na kwas askorbinowy (1 mM/L). Prawa oś i pełne kółka prezentują względne natężenie USL roślin po zadaniu 1 mM roztworem AsA (wartości średnie z dziesięciu pomiarów)

Przeprowadzone badania konsumpcji tlenu przez komórki glonów Characeae w ciemności, potwierdzają zjawisko pobierania tlenu ze środowiska przez badane glony (Dudziak i wsp. 2001). Po zadaniu AsA, zawartość tlenu w środowisku z roślinami spadała szybciej ( $T_{(1/2)} = 50$  min) aniżeli w środowisku bez roślin ( $T_{(1/2)} = 5,5$  h) (rys. 6.7). Zwiększona obecność askorbinianu

w komórce, może dodatkowo intensyfikować proces oddychania, a tym samym i pobór tlenu ze środowiska.



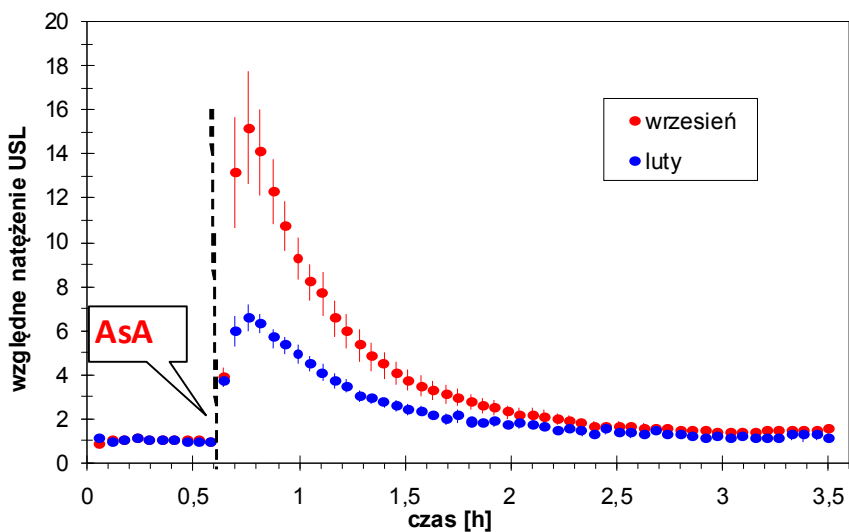
Rys. 6.7. Procentowe stężenie tlenu w APW z roślinami Characeae i bez roślin, po dodaniu AsA (1mM/L). Pomiary przeprowadzono w ciemności (Dudziak i wsp 2001)

Zaobserwowano, że kinetyka zmian USL po ekspozycji badanych roślin na działanie AsA w okresie letnio-jesiennym jest odmienna aniżeli w okresie zimowo-wiosennym. Szczególnie duża różnica występowała pomiędzy próbkami ekspozycyjnymi na 10 mM roztwór AsA z okresu września i lutego (rys 6.8). Przebiegi tych zmian dla komórek „wrześniowych” posiadały od 2 do 3 razy większe wartości maksymalne, natomiast ich spadki były gwałtowniejsze. Wyglądało to tak, jakby stężenie bioczynnika było większe. Efekt taki mógł być spowodowany większą zawartością substancji wolnorodnikowych w roślinach z okresu letnio-jesiennego i mniejszą ich odpornością na działanie czynników zewnętrznych (porównaj wykresy na rys. 5.7 natężeń USL młodych jedno-rocznych komórek wiosennych, z wieloletnimi, które przetrzymały na dnie jeziora).

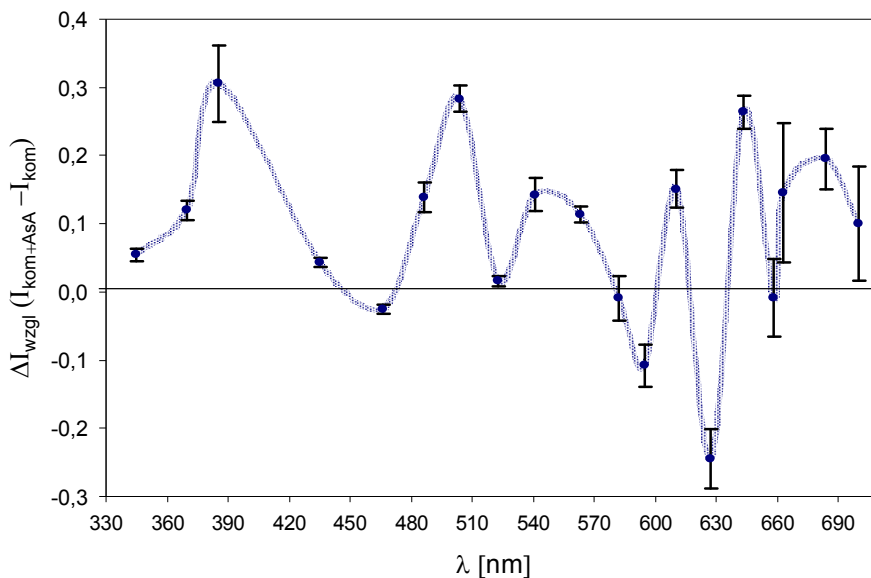
Przeprowadzono także analizę zmian widma USL glonów Characeae w warunkach ich ekspozycji na działanie AsA (Jaśkowska i wsp. 2001b).

Otrzymane widmo różnicowe (rys. 6.9) wykazuje podwyższenie emisji przy około 385 nm oraz w środkowej części tj. przy około: 500 nm, 550 nm i 610 nm. W obszarze czerwieni obserwujemy wzrost emisji dla około 640 nm oraz prawdopodobnie w zakresie 670–700 nm.





Rys. 6.8. Zależności znormalizowanych natężeń USL komórek *Nitellopsis obtusa*, mierzonych we wrześniu i w lutym w sytuacji ich ekspozycji na 10 mM roztwór AsA. Dane uśrednione z 10 serii pomiarowych. Normalizację uzyskano względem średniej uzyskanej z pomiarów przeprowadzonych przed zadaniem biocynnika (po odjęciu tła). Zaznaczono błędy standardowe



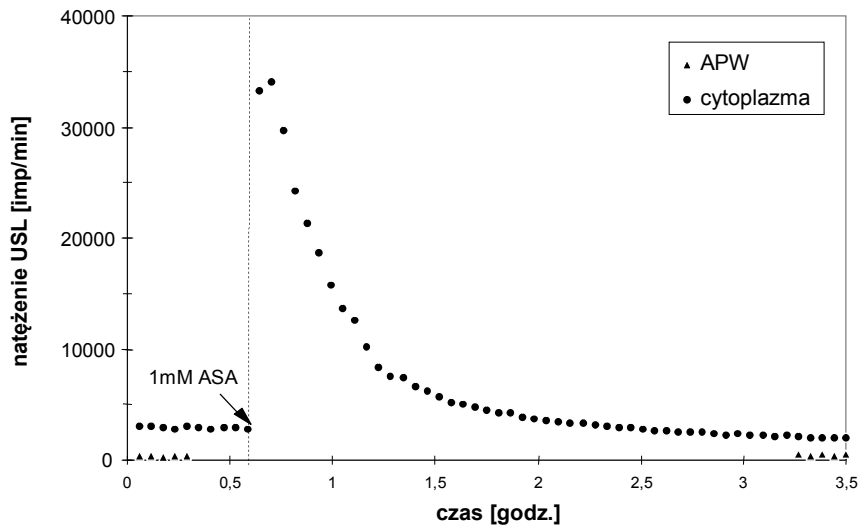
Rys. 6.9. Spektrogram różnicy względnych natężeń USL komórek nie traktowanych biocynnikiem (średnia z 26 serii – z rys. 5.12) i komórek po dodaniu 1 mM AsA – średnia z trzech serii. Zaznaczono błędy standardowe

Wzrost emisji dla około 385 nm oraz 500 nm może świadczyć o generowaniu – kolejno:  $2O_2(^3\Sigma^-_g)$  oraz  $^3(=C=O)$ , co z kolei może mieć związek ze wzmożeniem procesów wolnorodnikowych. Cały środkowy obszar widma może być związany ze wzrostem emisji FMN, NADH,  $Q_{10}$  i cytochromów biorących udział w transporcie elektronów w łańcuchu oddechowym mitochondriów, co sugeruje wzmożenie procesów oddychania w ciemności pod wpływem AsA. Potwierdza to pomiar konsumpcji tlenu (rys. 6.7).

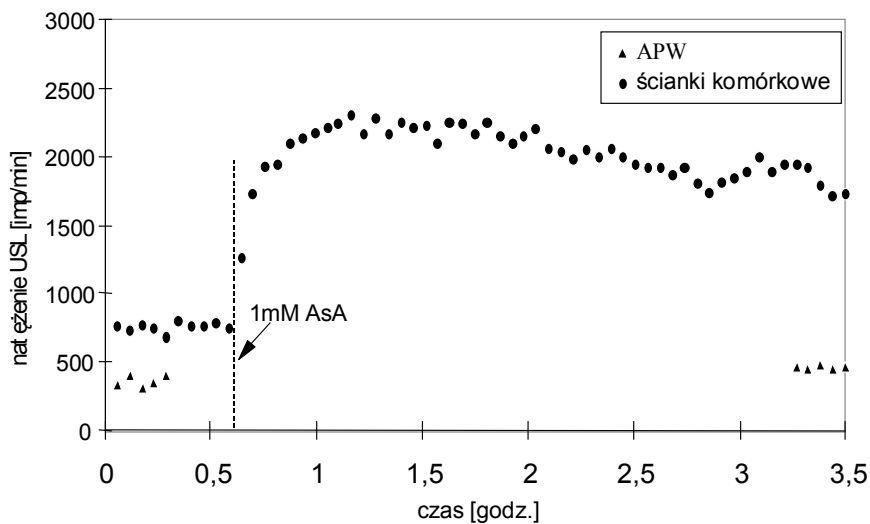
Wzmoczony proces oddychania, może mieć też związek ze zwiększeniem „wycieku” elektronów łańcucha oddechowego, prowadzącym do peroksydacji lipidów błony mitochondrialnej, odpowiedzialnej za generowanie tlenu singletowego oraz wzbudzonych grup karbonylowych. Wzrost intensywności promieniowania w „czerwonej” części widma, może odpowiadać emisji chlorofilu, który pochłania światło z zakresu wysokoenergetycznej części widma. Jest możliwe również, że AsA ma wpływ na zwiększenie transportu elektronów w fotosystemach (Silva i wsp. 1991), co może być także związane ze wzrostem intensywności USL chlorofilu. Jedyne istotne obniżenie natężenia ultrasłabego świecenia obserwujemy dla zakresu spektralnego, w którym występuje emisja  $2O_2(^1\Delta_g)$  (634 nm). Być może tylko w tym zakresie można obserwować (nie zdominowany przez procesy zwiększające ultrasłabą emisję fotonową) efekt antyoksydacyjnego działania kwasu askorbinowego.

W celu bliższego poznania reakcji AsA z komórką, przeprowadzono pomiary natężenia USL dla pewnych jej struktur wyodrębnionych z komórek Characeae oraz pewnych frakcji (sposoby uzyskania struktur i frakcji opisane zostały w rozdziale 4). Zmiany natężeń USL wywołane dodaniem AsA do wyizolowanych struktur i frakcji (w APW) prezentowane są na rys. 6.10–6.14. Ekspozycja wyizolowanej cytoplazmy na 1 mM roztwór AsA (rys. 6.10), powoduje gwałtowny wzrost natężenia USL oraz dość szybki jego spadek. Dla ścianek komórkowych (rys. 6.11) krzywa jest zgoła inna, łagodniejsza. Podobny, łagodniejszy charakter krzywej obserwujemy dla frakcji błonowej (rys. 6.12). Porównując powyższe wykresy z krzywymi odzwierciedlającymi działanie AsA na całe komórki (rys. 6.2), można dojść do wniosku, że przy wysokich stężeniach AsA w APW z komórkami reakcje zachodzą głównie w części cytoplazmatycznej (porównanie z wykresem dla cytoplazmy), natomiast dla stężeń mniejszych, większość reakcji może zachodzić w ścianie komórkowej lub w jej pobliżu np. w błonie komórkowej (porównanie z wykresem dla ściany komórkowej oraz frakcji błonowej). Jedyne dla frakcji rybosomalnej obserwowano spadek natężenia USL poniżej poziomu pomiaru kontrolnego, poprzedzającego podanie do próbki AsA. Przy 5 mM stężeniu AsA, spadek ten występuje po około 20 minutach, w trakcie których mamy do czynienia ze wzrostem natężenia USL (rys. 6.13). Dla innej próbki zawierającej frakcję rybosomalną zarejestrowano wyłącznie spadek intensywności USL, występujący dopiero po zadaniu 100 mM AsA – rys. 6.14 (wcześniejsze eksponowanie próbki na 1mM AsA nie dawało

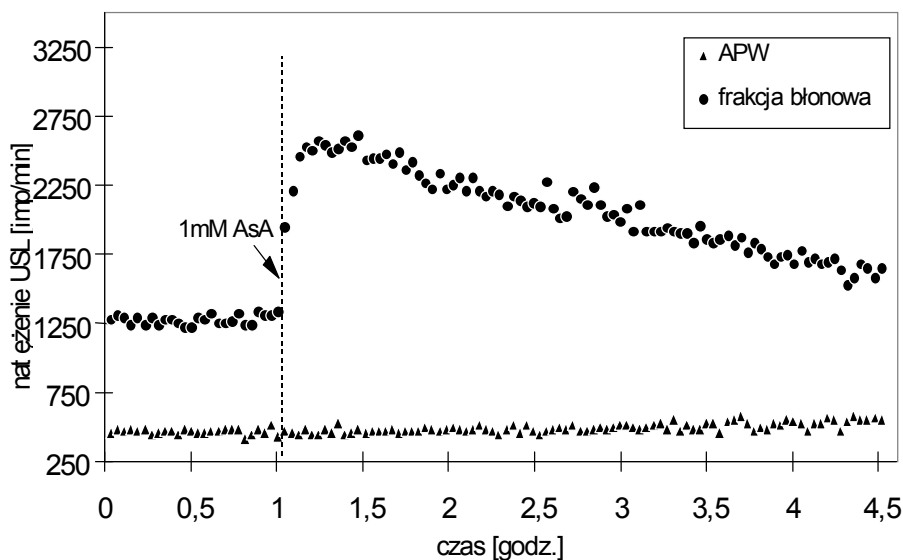
żadnych zmian w natężeniu USL). Takie obniżenie USL może świadczyć o antyoksydacyjnym i tym samym ochronnym działaniu AsA na molekuly RNA oraz DNA.



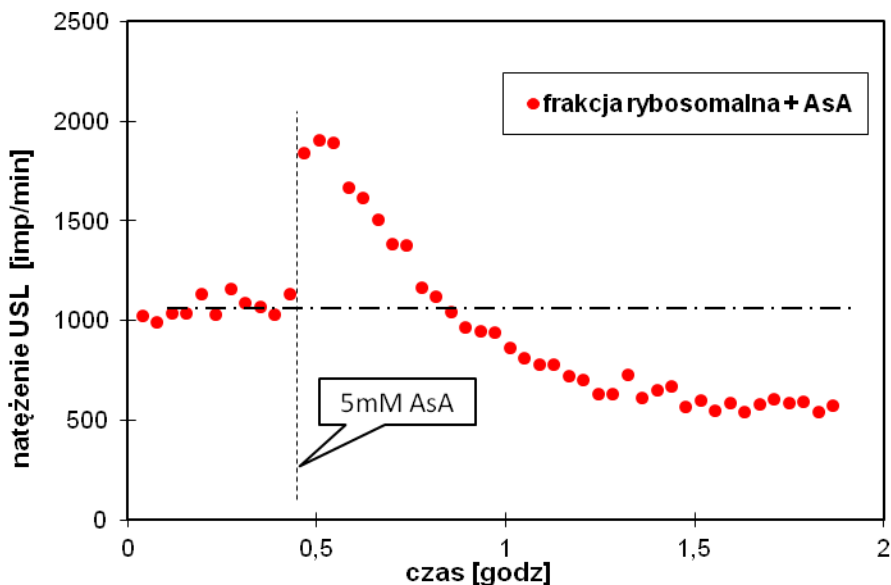
Rys. 6.10. Kinetyka zmian ultrasłabej luminescencji cytoplazmy wyizolowanej z 30 komórek *Nitellopsis obtusa* podczas ekspozycji na działanie 1mM roztworu AsA



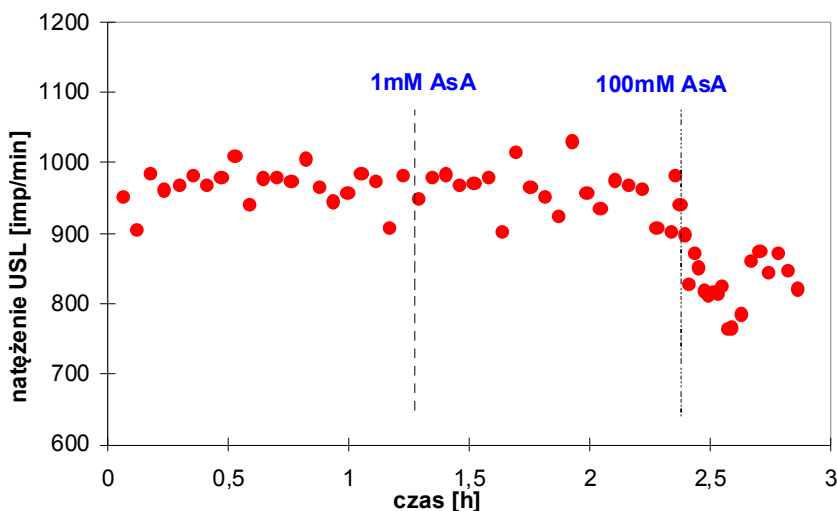
Rys. 6.11. Kinetyka zmian ultrasłabej luminescencji ścianek komórkowych po ekspozycji na działanie 1 mM roztworu AsA. Dane uśrednione z trzech serii pomiarowych (w każdej próbie ścianki z 40 komórek)



Rys. 6.12. Kinetyka zmian ultrasłabej luminescencji frakcji błonowej komórek *Nitellopsis obtusa* po zadaniu 1mM roztworu AsA



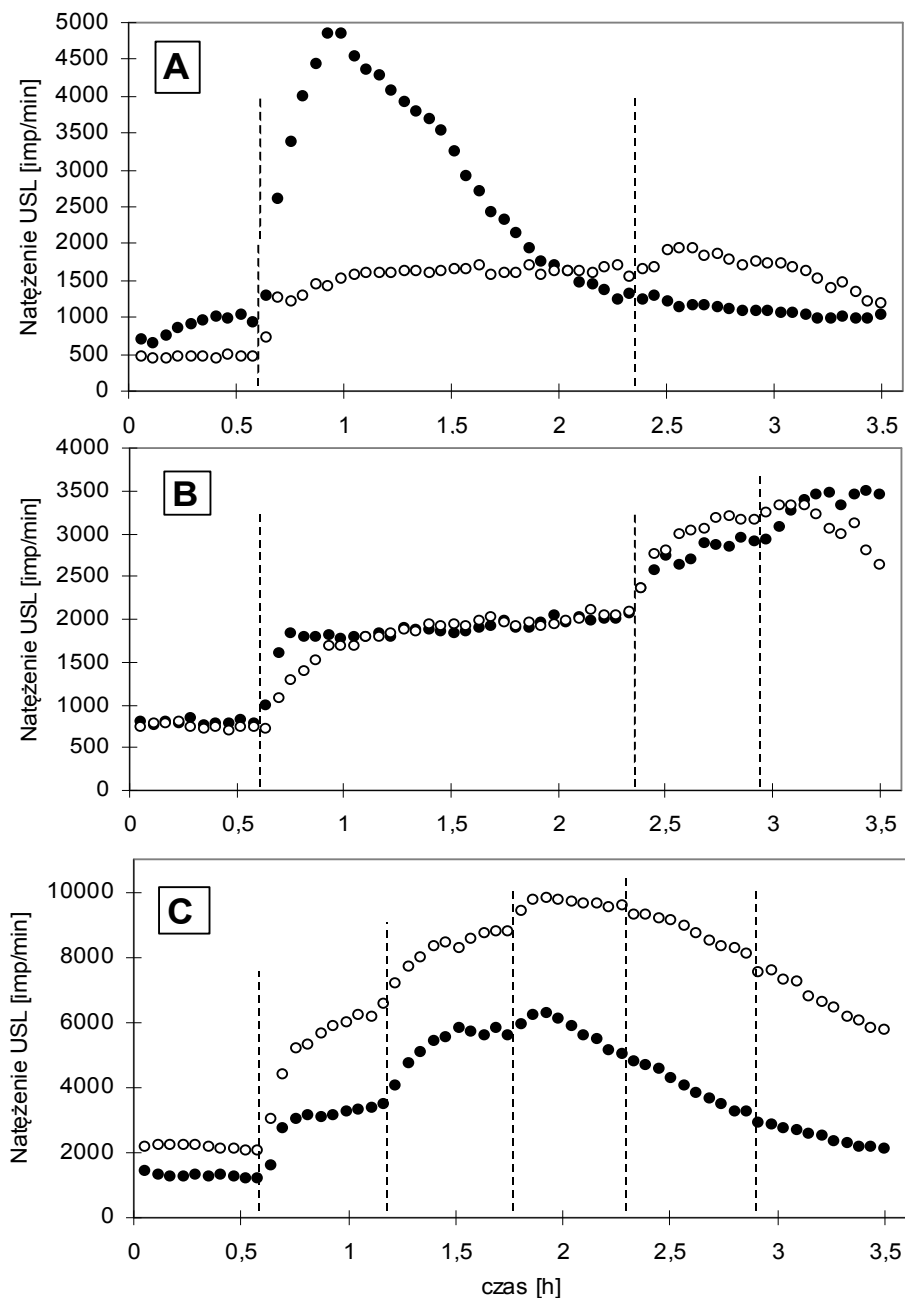
Rys. 6.13. Kinetyka zmian ultrasłabej luminescencji frakcji rybosomalnej komórek *Nitellopsis obtusa* podczas ekspozycji na 5 mM roztwór AsA (po odjęciu tła APW). Pozioma przerywana linia oznacza uśredniony poziom USL przed zadaniem AsA



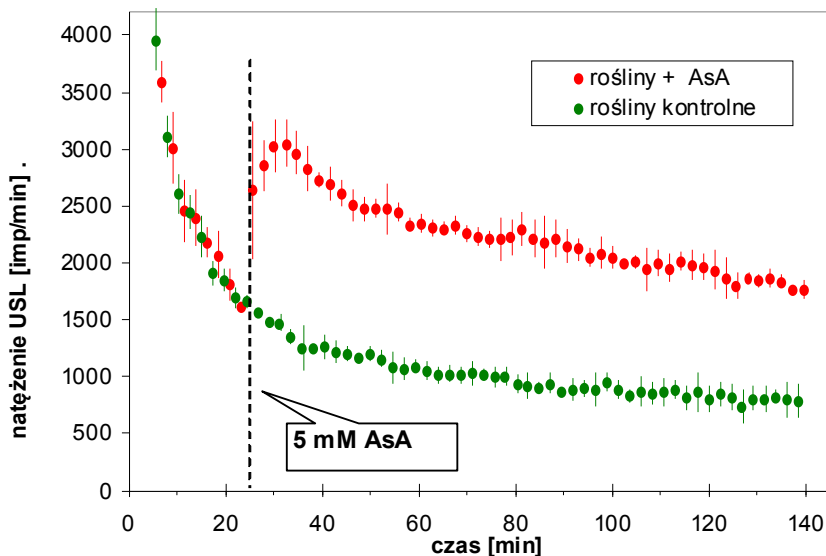
Rys. 6.14. Ultraślaba luminescencja frakcji rybosomalnej komórek *Nitellopsis obtusa* podczas ekspozycji na 1 mM oraz 100 mM roztwory AsA

Wykonano także badania, polegające na wielokrotnym podawaniu kwasu askorbinowego (o tym samym stężeniu) do próbki z komórkami Characeae, co pozwalało oszacować czas wysycenia badanych komórek reagentem. Dla zadanego dwa razy po 5 mM AsA do środowiska z dwiema różnymi przykładowymi próbkami roślin, otrzymano dwie odmienne kinetyki reakcji USL na zadany bioczynnik (rys. 6.15 A). W przypadku przebiegu, w którym USL osiąga szybki spadek (po intensywnym wzroście), drugie dodanie AsA nie powoduje już wzrostu świecenia. Natomiast dla roślin, w których USL po osiągnięciu maksimum pozostaje dalej w przybliżeniu stabilne, drugie dodanie AsA powoduje wzrost ultrasłabego świecenia. Podobne zachowanie stwierdzono po trzykrotnym zadaniu 1 mM roztworu AsA (rys. 6.15 B). W przypadku pięciokrotnego zadawania 1 mM roztworu AsA (rys. 6.15 C) wzrosty USL przestają być zauważalne dla dwóch ostatnich dawek bioczyownika.

Powyższe wyniki badań sugerują, że wysycenie komórek kwasem askorbinowym występuje wówczas, gdy proces USL jest w fazie spadkowej. Sugeruje to, że mamy do czynienia z wyczerpywaniem się substratów we wszystkich fazach strukturalnych badanego obiektu i dodatkowa ilość AsA nie napotyka już na związki mogące z nim reagować. Chcąc jednoznacznie dowieść antyoksydacyjnego charakteru działania kwasu askorbinowego, wykonano badania intensywności USL, zadając AsA do próbki z roślinami przetrzymywanymi w ciemności tylko 30 minut, dla których trwał jeszcze proces wyświecania. Jednakże zaraz po podaniu reagenta występował wyłącznie wzrost intensywności USL (rys. 6.16).



Rys. 6.15. Kinetyka procesu ultrasłabej luminescencji podczas wielokrotnego zadawania AsA do środowiska APW z komórkami *Nitellopsis obtusa*: A)  $2 \times 5$  mM AsA, B)  $3 \times 1$  mM AsA C)  $5 \times 1$  mM AsA. Pionowe przerywane linie oznaczają momenty zadawania bioczynnika. Każdy rysunek przedstawia dwie przykładowe serie pomiarowe



Rys. 6.16. Kinetyka ultrasłabej luminescencji roślin *Nitellopsis obtusa* podczas ekspozycji na 5 mM roztwór AsA. Bioczynnik zadawano 30 minut po umieszczeniu roślin w światłoszczelnej komorze aparatury pomiarowej. Średnia z 4 serii pomiarowych, zaznaczono odchylenia standardowe

Przeprowadzono także uzupełniające pomiary prędkości ruchu cytoplazmy i oporu błony komórkowej. Prędkość ruchu cytoplazmy, w komórkach *Nitellopsis obtusa* po zadaniu AsA zwiększała się do 0,065 mm/s i po około 23 minutach wracała do wartości wyjściowej, wynoszącej 0,045 mm/s. Opór plazmalemy pokazywał tendencję wzrostową, która nie wskazywała na stabilizację nawet po upływie 90 minut, osiągając w tym czasie wzrost o około 30%.

Na podstawie eksperymentów opisanych w niniejszym rozdziale, może nasunąć się pytanie - dlaczego po zadaniu AsA w badanych próbkach obserwuje się wzrost intensywności USL? Traktując USL jako skutek reakcji wolnorodnikowych, należałoby się spodziewać raczej obniżenia jego natężenia pod wpływem AsA. Obserwowany szybki wzrost świecenia może być skutkiem prooksydacyjnego działania AsA w początkowym okresie; AsA ulegając utlenianiu może być źródłem elektronów, które generując szereg reakcji chemicznych prowadzą do wytworzenia molekuł elektronowo wzbudzonych powodujących zwiększenie natężenia USL. Prooksydacyjne działanie AsA może być również związane z występowaniem w próbce biologicznej jonów metali przejściowych, w obecności których AsA inicjuje reakcje generujące wolne rodniki. Wiadomo

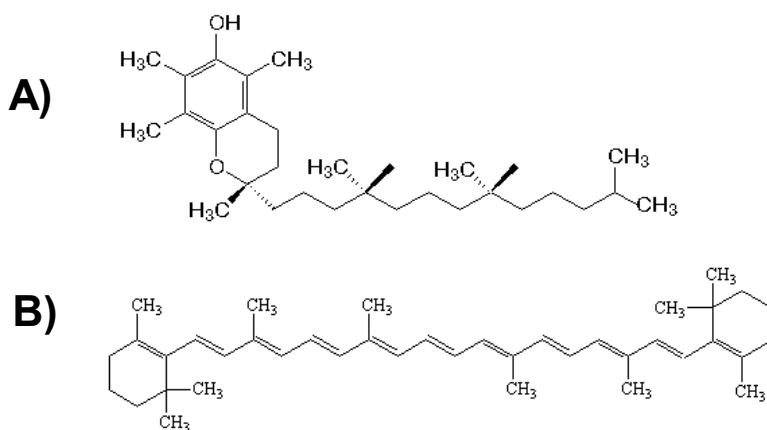
bowiem, że właśnie askorbinian z jonami żelaza wykorzystywany jest jako czynnik inicjujący peroksydację lipidów w badanych strukturach modelowych błon biologicznych (Leyko i wsp. 1991).

Możliwa jest także sytuacja, że AsA – występujący w roztworze APW w formie jednowymennego anionu askorbinowego – nie wnika w głąb komórki (formy jonowe trudno przenikają przez błony lipidowe), lecz reaguje na powierzchni plazmalemy.

W literaturze można znaleźć opis badań, w których AsA powodował obniżenie natężenia USL badanych obiektów biologicznych (Maccarrone i wsp. 1995, Radotić i wsp. 1990), jednakże obniżenie to następowało po uprzednim zadziałaniu czynnika zewnętrznego, wywołującego powstawanie wolnych rodników.

## 6.2. Wpływ $\alpha$ -tokoferolu i $\beta$ -karotenu

Zarówno  $\alpha$ -tokoferol jak i  $\beta$ -karoten są zaliczane do najistotniejszych antyoksydantów hydrofobowych (Palozza i wsp. 1992).



Rys. 6.17. Struktura  $\alpha$ -tokoferolu – (A) oraz  $\beta$ -karotenu – (B)

$\alpha$ -tokoferol (rys 6.17A) należy do grupy tokoferoli i wraz z toko-trienolami stanowi pulę związków, zwanych witaminą E. Syntetyzowany jest wyłącznie przez organizmy fotosyntetyzujące i pełni ważną funkcję ochronną, zwłaszcza w aparacie fotosyntetycznym (Munné-Bosch i Alegre 2002). Zlokalizowany w błonach lipidowych stabilizuje ich strukturę, usuwając rodnikowe formy tlenu, rodniki nadtlenkowe lipidów,

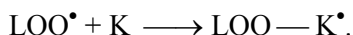


a także tlen singletowy. Jako antyoksydant,  $\alpha$ -tokoferol (TOH) chroni struktury błonowe, uczestnicząc w reakcjach wolnorodnikowych:



Rodnik tokoferylowy  $\text{TO}^\bullet$  jest stosunkowo mało reaktywny i może wejść w reakcję z innym wolnym rodnikiem lub ulec redukcji przez inne antyoksydanty.

$\beta$ -karoten (rys. 6.17 B) należy do grupy karotenoidów, barwników występujących w plastydach tkanek fotosyntetycznych i niefotosyntetycznych. Związek ten może być biosyntetyzowany w roślinach i bakteriach fotosyntetyzujących (Carotenoids 1998). Karotenoidy (K), podobnie jak tokoferole, są efektywnymi wygaszaczami tlenu singletowego. Reagują również z organicznymi wolnymi rodnikami, powstającymi w procesie peroksydacji lipidów:



Wolny rodnik  $\text{K}^\bullet$  z niesparowanym elektronem w atomie węgla, może reagować z następnym rodnikiem nadtlenu lipidu, pozbawiając substraty w efekcie końcowym – wolnorodnikowego charakteru. Poza funkcjami antyoksydacyjnymi, karotenoidy odgrywają rolę wspomagającą zbieranie światła w fotosystemach. Jednakże główną funkcją  $\beta$ -karotenu, w systemach fotosyntetycznych jest najprawdopodobniej wygaszanie stanu trypletowego chlorofilu i rozpraszanie energii w postaci ciepła, co zapobiega powstawaniu tlenu singletowego.

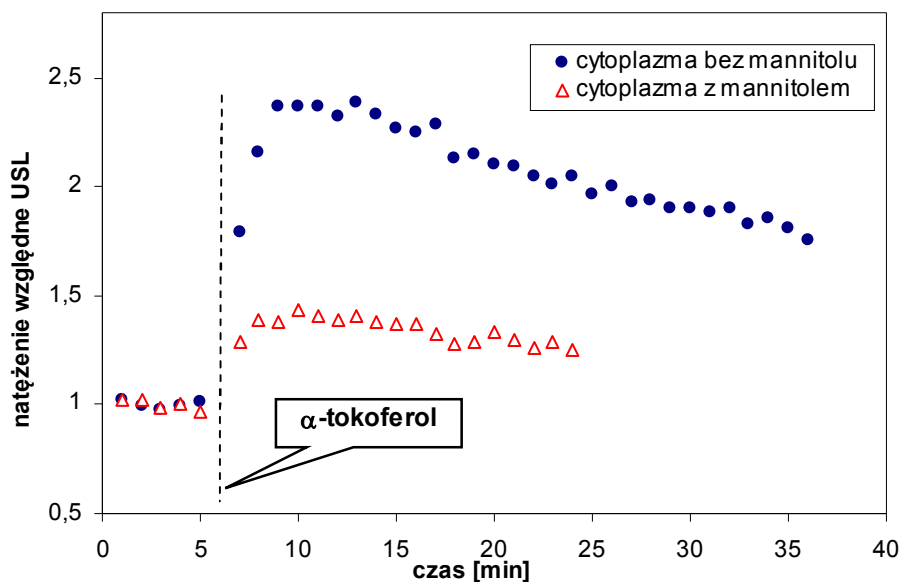
Przeprowadzono pomiary wpływu  $\alpha$ -tokoferolu i  $\beta$ -karotenu na zmiany natężenia ultrasłabej luminescencji zadając biocynniki do środowiska z badanymi próbkami. Zarówno  $\alpha$ -tokoferol jak i  $\beta$ -karoten, jako związki hydrofobowe, są dobrze rozpuszczalne w błonach lipidowych. Aby uzyskać efekt oddziaływania tych antyoksydantów z badanymi strukturami komórkowymi, przeprowadzono ich sonifikację, rozdrabniając je do postaci liposomów o średnicach około kilkudziesięciu nm (dokładniejszy opis znajduje się w Aneksie IV). Tak powstałe elementy mogły wnikać w głąb badanych struktur błonowych, oddziałując z nimi.

Zarówno dla  $\alpha$ -tokoferolu jak i  $\beta$ -karotenu, badania przeprowadzono na różnych frakcjach komórek *Nitellopsis obtusa*. Sposoby otrzymywania frakcji omówiono w rozdziale 4.

Stosując  $\alpha$ -tokoferol, określono zmiany intensywności USL roztworu z wyizolowaną cytoplazmą. Próbka pomiarowa zawierała cytoplazmę wyciśniętą z 30 komórek międzywęzłowych, wymieszaną z 20 ml wody redestylowanej. Do tak sporządzanych próbek dodawano  $\alpha$ -tokoferol, uzyskując stężenie 0,35  $\mu\text{M/L}$   $\alpha$ -tokoferolu w roztworze.

Wyniki serii pomiarowych z dwóch próbek przedstawiono na rysunku 6.18. Próbki różniły się tym, że jedna z nich zawierała mannitol mający za zadanie

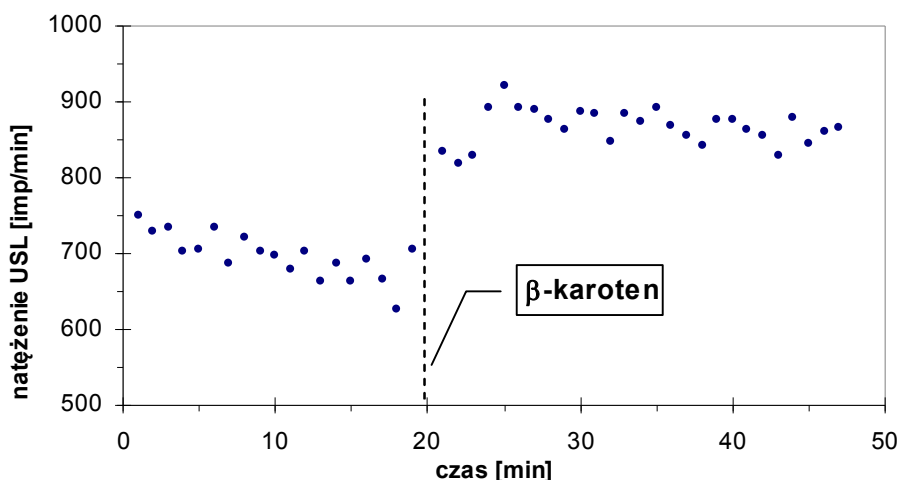
chronić mitochondria przed destrukcją. Maksymalne zabezpieczenie mitochondriów uzyskiwano na drodze dwuetapowego zadawania mannitolu: 1) przed wyciśnięciem cytoplazmy – komórki przetrzymywano w APW z mannitolem (0,35 M) przez 25 minut, 2) cytoplazmę z komórek wyciskano do roztworu, zawierającego 0,35 M mannitolu. Pomiar ultrasłabej luminescencji rozpoczynano po 6 godzinach od umieszczenia próbek w światłoszczelnej komorze pomiarowej. Po zadaniu  $\alpha$ -tokoferolu, w obydwu próbkach obserwowano wzmożenie intensywności USL z tym, że dla cytoplazmy bez mannitolu „maksimum intensywności” było około 3 razy większe. Wyniki pomiarów otrzymane po około 3 godzinach od zadania bioczynnika – zarówno dla próbek bez mannitolu jak i z mannitolem – nie wykazywały spadku intensywności USL poniżej średniego poziomu, określonego przed zadaniem bioczynnika (wyniki nie pokazane na rysunku). Uzyskane wyniki na rysunku 6.18 można tłumaczyć tym, że uszkodzone mitochondria (z powodu braku mannitolu) dostarczają o wiele większą ilość elektronów, które powodują reakcje prowadzące do dodatkowych wzbudzeń napotkanych molekuł.



Rys. 6.18. Względny poziom natężenia USL dla próbki z wyizolowaną cytoplazmą (z 30 komórek *Nitellopsis obtusa*) po ekspozycji na 0,35  $\mu$ M  $\alpha$ -tokoferol. Natężenie względne uzyskano dzieląc wyniki pomiarów przez wartość średnią z danych pomiarowych otrzymanych przed zadaniem bioczynnika

$\beta$ -Karoten zadany do APW z wyizolowaną cytoplazmą (bez chloroplastów), powodował wzrost intensywności USL (rys. 6.19) i utrzymywanie się tego

podwyższonego poziomu przez ponad 2 godziny (wyniki nie pokazane na rysunku). Przed wyciśnięciem cytoplazmy – komórki przetrzymywano 30 minut w 0,35 M mannitolu. Przy takim samym stężeniu  $\beta$ -karotenu w APW z chloroplastami, odwirowanymi uprzednio z cytoplazmy, obserwowano gwałtowny wzrost intensywności USL, a następnie jej spadek – w przybliżeniu do poziomu świecenia, występującego przed zadaniem bioczyownika (rys. 6.20). Próbkę z cytoplazmą i chloroplastami przetrzymywano przed pomiarami w ciemności przez 7–8 godzin. Jednak nawet po takim czasie trwał jeszcze proces wyświecania światła, najprawdopodobniej z chloroplastów zawartych w próbce, co widać dość wyraźnie na rysunku 6.20.

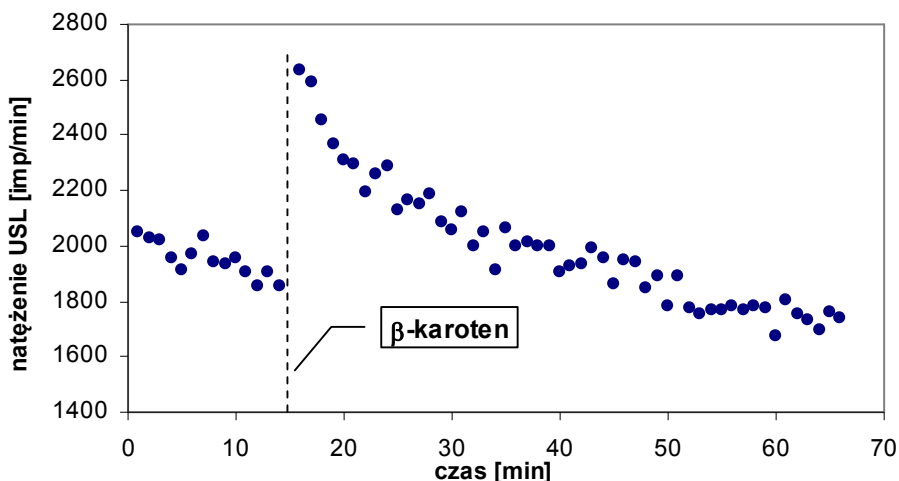


Rys. 6.19. Natężenie USL próbki z wyizolowaną cytoplazmą z komórek *Nitellopsis obtusa* (bez chloroplastów) – przed i po ekspozycji na  $\beta$ -karoten o stężeniu 10 mg/L

Dodanie  $\beta$ -karotenu do roztworu z żywymi komórkami *Nitellopsis obtusa* nie wywoływało istotnych zmian natężenia USL. Taki efekt mógł być spowodowany działaniem zaporowym ścianki komórkowej i plazmalemy (liposomy  $\beta$ -karotenu nie wnikały dostatecznie intensywnie w głąb plazmalemy).

Analizując otrzymane wyniki, można skonstatować, że nie potwierdzają one antyoksydacyjnego charakteru działania  $\alpha$ - tokoferolu na cytoplazmę wyizolowaną z badanych komórek (rys. 6.18). Obserwowane podwyższenie intensywności USL może oznaczać, że w zadanym stężeniu – w pierwszych godzinach działania bioczyownika – następuje nasilenie reakcji wolnorodnikowych, w efekcie których powstają wzbudzone produkty odpowiedzialne za chemiluminescencję.

Większa intensywność luminescencji próbki nie eksponowanej na działanie mannitolu sugeruje, iż oddziaływanie  $\alpha$ -tokoferolu (inicjujące reakcje prooksydacyjne) na cytoplazmę zawierającą bardziej rozdrobnione fragmenty błon (rozerwane mitochondria) – jest większe. Efekt ten może być związany bądź ze zwiększoną penetracją bioczynnika w rozerwane struktury błonowe bądź z jego oddziaływaniem z biomolekułami uwolnionymi z uszkodzonych organelli. Kształt uzyskanego zaniku emisji jest bardzo podobny do otrzymanego dla frakcji błonowej, poddanej działaniu 1mM roztworu AsA (rys.6.12). Można przypuszczać, że podobieństwo to wynika z faktu, iż  $\alpha$ -tokoferol dodany do cytoplazmy, jako antyoksydant hydrofobowy – lokalizuje się w błonach i tam wywołuje reakcje związane ze wzrostem intensywności USL.



Rys. 6.20. Natężenie USL próbki wyizolowanych chloroplastów z komórek *Nitellopsis obtusa* – przed i po ekspozycji na  $\beta$ -karoten o stężeniu 10 mg/L

$\beta$ -karoten (rys. 6.19), podobnie jak  $\alpha$ -tokoferol (w stosowanych stężeniach), działają na cytoplazmę prooksydacyjnie. Utrzymywanie się tego efektu dość długo – nawet ponad 2 godziny – może oznaczać, że mamy tutaj do czynienia z dużym stężeniem tlenu w środowisku (Truscott 1996).

Dla chloroplastów (rys. 6.20) dominacja prooksydacyjnych reakcji występuje tylko w pierwszych 30 minutach od momentu podania reagenta. Kształt otrzymanego przebiegu jest podobny do tego, jaki uzyskano przy oddziaływaniu 5 mM AsA na frakcję rybosomalną (rys. 6.13), gdzie po takim samym czasie obserwowaliśmy działanie antyoksydacyjne. Być może dla chloroplastów i beta-

karotenu także zachodzi taki proces, ale nie jest on wyraźnie dostrzegalny ze względu na trwający jeszcze proces wyświecania.

Nieco spadkowa tendencja intensywności USL na początku pomiarów (przed zadaniem bioczynnika), jest zapewne wynikiem trwającego jeszcze procesu wyświecania.

Znane są efekty, powodujące obniżanie intensywności ultrasłabej chemiluminescencji (indukowanej uprzednio przez czynniki wzmagające efekty wolnorodnikowe) po ekspozycji na działanie  $\alpha$ -tokoferolu (Maccarrone i wsp. 1995, Miyazawa i wsp. 1983), jak też  $\beta$ -karotenu (Torinuki i wsp. 1982, Miyazawa i wsp. 1981).

## 7. Zmiany ultrasłabej emisji fotonowej indukowane wahaniami temperatury

Temperatura jest jednym z istotnych czynników powodujących zmiany natężenia USL organizmów żywych. Wzrost temperatury ułatwia powstawanie stanów wzbudzonych cząsteczek (Abeles 1986), powoduje także zwiększenie energii translacyjnej, oscylacyjnej i rotacyjnej reagujących cząsteczek, czemu towarzyszy większa intensywność reakcji chemicznych odpowiedzialnych za szereg procesów przebiegających w komórce. Temperatura ma także wpływ na aktywności enzymatyczne białek – ich wartości maksymalne występują w zakresie temperatur fizjologicznych (Elias i wsp. 2014). Wymienione powyżej czynniki, odpowiadają za intensywność przemian metabolicznych. Zmiana metabolizmu komórkowego ma bezpośredni związek między innymi: z intensywnością i sprawnością oddychania oraz z intensywnością procesów wolnorodnikowych; te procesy – jak się powszechnie przyjmuje – mają istotny wpływ na generowanie USL przez komórki.

Badane glony Characeae, to organizmy dość czułe na wysoką temperaturę. Żyją w środowisku wodnym, na dnach jezior i rozlewisk, gdzie zmiany temperatury nie są skrajnie duże i przebiegają powoli – w cyklu rocznym. Z tego powodu zmiany temperatury środowiska, przebiegające szybko lub wychodzące poza przedziały zmian występujące w środowisku naturalnym, mogą stanowić dla nich czynnik stresogenny wpływający w znaczący sposób na stan ich funkcjonowania.

Wiadomym jest, że zmieniając temperaturę otoczenia roślin Characeae w zakresie fizjologicznym obserwujemy zmiany wielu parametrów komórkowych, np.: potencjału czynnościowego (Blatt 1974), potencjału i oporu błonowego (Hogg i wsp. 1968, Paszewski i Śpiewła 1986), oporu i pojemności węzła (Ogata 2000), aktywności kanałów jonowych (Djurisić i Andjus 2000, Demidchik i wsp. 2001), aktywności kanałów wodnych (Hertel i Steudle 1997) oraz szybkości ruchu cytoplazmy (Uchida i wsp. 1995).

Dla zakresu temperatur fizjologicznych, zmiany natężenia USL żywych organizmów są skorelowane ze zmianami temperatury i zależność ta spełnia w przybliżeniu równanie Arrheniusa. Obserwowane odstępstwa (w przebiegu natężenia USL) od prawa Arrheniusa, mogą mieć odzwierciedlenie w zmianie rozkładu spektralnego, co może posłużyć do identyfikacji zmian pewnych procesów w organizmach roślinnych (Konev i wsp. 1974). Takie odstępstwa można zauważyć zwłaszcza wtedy, gdy organizm dozna stresu wywołanego ekstremalnymi temperaturami, wówczas zmiany USL można wykorzystać do badania zdolności adaptacyjnych, np. roślin uprawnych (Tarusov i Wiesoowski 1978). Pod wpływem intensywnego wzrostu temperatury organizm doznaje szoku termicznego odpowiedzialnego za generowanie wolnych rodników, co ma

odzwierciedlenie we wzroście ultrasłabej emisji fotonowej. Intensywność emisji jest zależna nie tylko od wartości osiągniętej temperatury, ale także od szybkości jej zmian (Kobayashi i wsp. 2014).

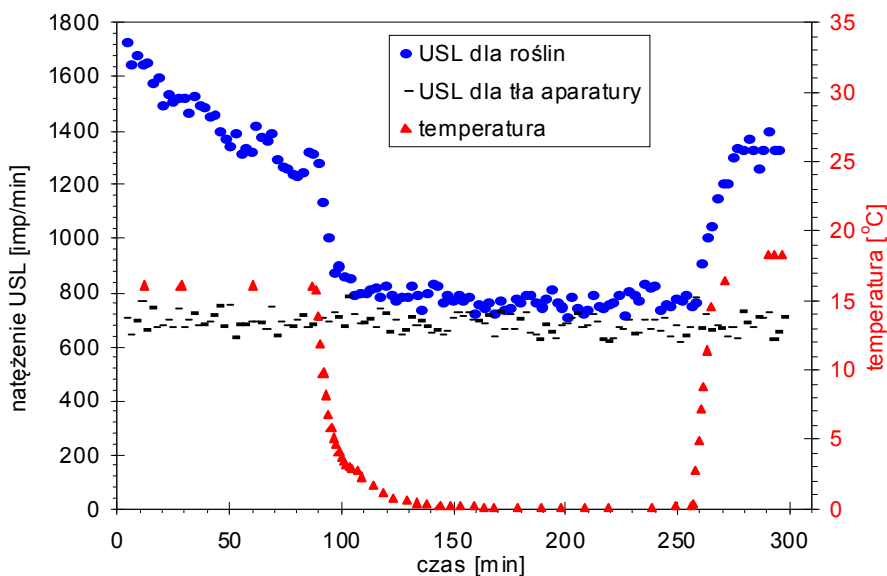
Gdy temperatura badanego materiału (wcześniej naświetlonego) zostaje zwiększana szybko i w odpowiednio szerokim zakresie (np. od  $-60$  do  $+100^{\circ}\text{C}$  z prędkością  $30^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ ), to wówczas można otrzymać lokalne maksima luminescencji. Takie zjawisko „indukowanej termicznie” luminescencji nazywamy termoluminescencją (Ducruet i Vass 2009, Rappaport, i Lavergne 2009). Termoluminescencja z materiału roślinnego jest bardzo użyteczna do badania fotosyntetycznego transportu elektronów (Inoue 1996), może być również wykorzystana (tak, jak ultrasłaba luminescencja spontaniczna) do wykrywania stresu oksydacyjnego (Havaux 2003).

Zostało stwierdzone, że ultrasłaba luminescencja organizmu roślinnego, przetrzymywanego w stałej podwyższonej temperaturze przez pewien czas (najczęściej kilka godzin), stopniowo obniża się, dążąc do stanu, jaki panował przed zaburzeniem (Popp i wsp. 1984a, Iyozumi i wsp. 2002). Taka reakcja jest typowa dla większości funkcji fizjologicznych zależnych od temperatury. Zatem wskazuje to na bezpośrednie powiązanie USL z wieloma procesami fizjologicznymi, zachodzącymi w komórce (Böhm 1980, Precht i wsp. 1973).

Gdy organizm roślinny poddawany jest cyklicznym zmianom temperatury, to zależność natężenia USL  $I = f(T)$  ma charakter pętli (krzywa wzrostowa nie pokrywa się ze spadkową), zwanej pętlą histerezy temperaturowej. Różnice w przebiegach krzywych badanych *in vivo* organizmów roślinnych, odzwierciedlają stan naruszenia ich homeostazy (Sławiński i wsp. 1974, Sławiński i wsp. 1980, Borc i wsp. 2011). Różnice takie były również obserwowane w modelowych układach, inicjujących łańcuchowe reakcje wolnorodnikowe (Baskakov i Vovyeikov 1995). Zjawisko to ma swoje odzwierciedlenie w różnych (zmieniających się) wartościach energii aktywacji (Popp i wsp. 1984a, Sławiński i wsp. 1980). „Temperaturowe odpowiedzi” roślin, emitujących ultrasłabe promieniowanie elektromagnetyczne, zostały opisane z użyciem pojęć struktur dyssypatywnych – termodynamicznych układów otwartych (Popp i wsp. 1984a, Sławiński i Popp 1987).

Wydawało się interesujące zbadać, w jaki sposób zmienia się natężenie USL badanych roślin wodnych Characeae, w zależności od zmian temperatury ich środowiska.

Gdy zmiany temperatury odbywały się w zakresie dobrze tolerowanym przez rośliny, wówczas krzywa intensywności USL była wiernym odbiciem krzywej zmian temperatury (rys. 7.1). Z otrzymanych zależności wynika, że glony Characeae dobrze znoszą gwałtowne zmiany temperatury oraz przetrzymywanie w temperaturach bliskich  $0^{\circ}\text{C}$ , nawet przez okres około 2,5 godz.



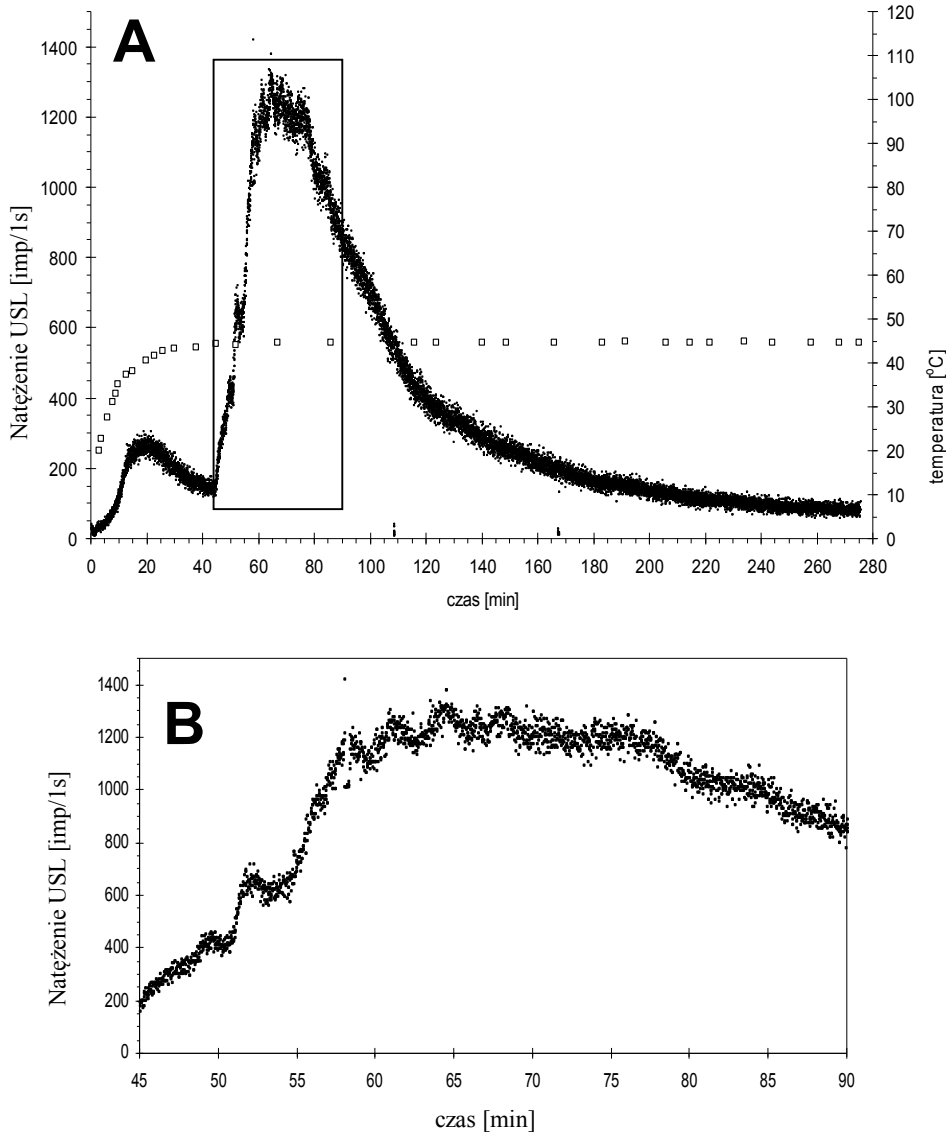
Rys. 7.1. Natężenie USL otrzymane dla próbki komórek *Nitellopsis obtusa* w funkcji czasu oraz temperatury. Krzywa spadkowa USL dla roślin w czasie od  $t = 0$  do  $t = 90$  min. jest przebiegiem trwającego jeszcze procesu wyświecania

W innych przeprowadzonych eksperymentach rejestrowano zmiany ultrasłabej luminescencji zaadaptowanych do ciemności roślin *Nitellopsis obtusa*, podwyższając temperaturę środowiska od warunków pokojowych ( $20^{\circ}\text{C}$ ) do  $45^{\circ}\text{C}$  i utrzymując ją na tym poziomie przez około 4 godziny (rys. 7.2). Podczas podwyższania temperatury do  $37^{\circ}\text{C}$  (szybkość zmian  $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ), obserwowano wzrost intensywności USL ( $I = f(T)$ ), mający w przybliżeniu charakter eksponencjalny. Przy dalszym podwyższaniu temperatury następowało zatrzymanie wzrostu natężenia USL, z przejściem w stopniowy spadek. Maksymalne wartości natężenia USL obserwowano dla temperatury około  $40^{\circ}\text{C}$ . Jego spadek, trwający około 20 minut, następował do momentu wystąpienia silnej erupcji (42 minuta pomiarów). Po tym czasie temperaturę utrzymywano już na stałym poziomie.

Maksymalna wartość tego gwałtownego wzrostu intensywności USL występowała po około 65 minutach od początku pomiarów, a odpowiadający jej poziom emisji wzrósł około 40 razy w stosunku do poziomu początkowego. W całym obszarze podwyższonej emisji, tj. w czasie od 45 do 70 minuty przebieg zmian intensywności USL miał charakter oscylacyjny (rys. 7.2B). W czasie gdy te zmiany stawały się bardziej łagodnie (od 70 do 90 minuty), charakteryzujące się wydłużonym okresem, następował stopniowy – coraz



łagodniejszy – spadek intensywności USL. W trakcie eksperymentu komórki przetrzymywano w podwyższonej temperaturze (40–45°C) przez okres 3,3 godziny i po ich wyjęciu z komory pomiarowej, żadna z komórek nie wykazywała oznak życia.



Rys. 7.2. A) Zmiany liczby zliczeń dla próbki komórek *Nitellopsis obtusa* w funkcji czasu przy zmieniającej się temperaturze. Znaczniki w kształcie kwadratów oznaczają temperaturę próbki. B) Powiększenie części wykresu obejmujące zmiany oscylacyjne w pobliżu maksimum

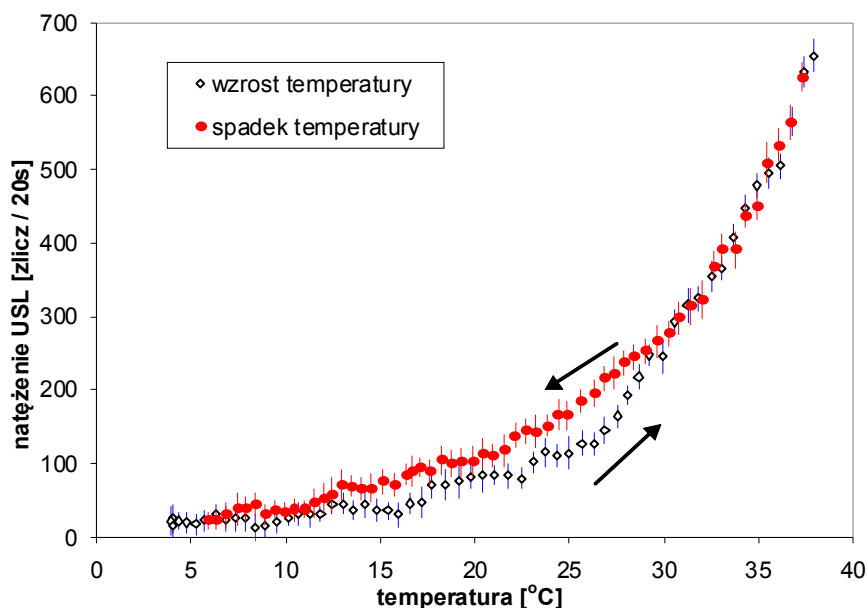
Charakterystyczne maksimum i spadek natężenia USL po osiągnięciu temperatury 40°C mogą być związane z degradacją struktur konformacyjnych enzymów i tym samym utratą ich zdolności transportowych. Objawiać się to może gwałtownym spadkiem ich aktywności, np. peroksydaz (Salin 1990). Takie zachowanie się procesu USL, może mieć także związek ze wzrostem płynności błony w wyniku przejścia fazowego (Scott i wsp. 1991).

Dla różnych roślin położenie omawianego maksimum intensywności USL względem osi temperatury, może się nieco różnić. Przesuwanie się maksimum ku wyższym temperaturom, oznacza większą zdolność adaptacyjną badanych roślin do wysokich temperatur (Tarusov i Wiesołowski 1978).

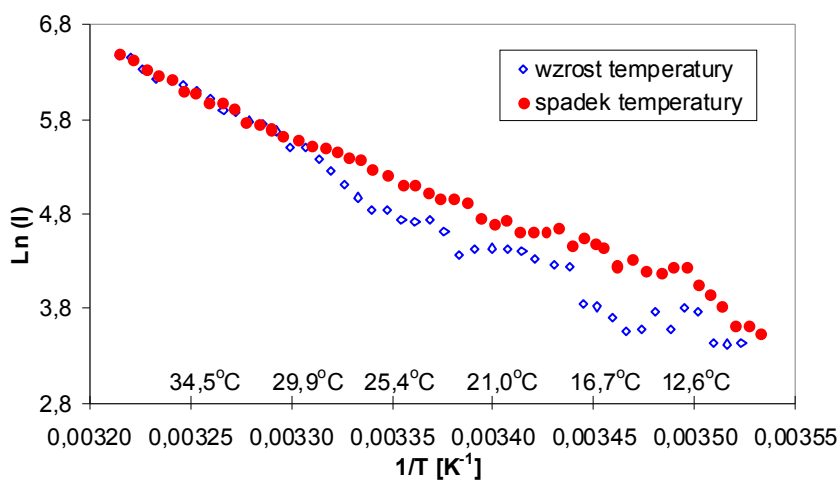
Następujący po 45 minucie gwałtowny wzrost intensywności świecenia, może świadczyć o niekontrolowanych procesach oksydacyjnych, związanych z uszkodzeniem antyoksydacyjnego aparatu obronnego komórek. Zjawisku temu towarzyszą lokalne „maksima” emisji o okresie równym 3 do 4 min, które mogą świadczyć o trwającej jeszcze „walce antyoksydacyjnej” aparatu obronnego komórek. Z czasem następuje jednak wyczerpywanie się substratów i dezaktywacja enzymów, czemu towarzyszy obserwowany stopniowy spadek świecenia, którego natężenie zmierza do poziomu tła. Tego typu przebieg zmian USL (powyżej 45 minuty pomiaru) jest charakterystyczny dla procesów nekrotycznych organizmów poddawanych różnym stresom (rys. 8.9).

Chcąc sprawdzić, w jaki sposób zmiany temperatur wpływają na zaburzenia homeostazy glonów *Nitellopsis obtusa*, przeprowadzono serię eksperymentów, w których rejestrowano ultrasłabe świecenie z próbek poddawanych cyklicznym zmianom temperatur (Borc i wsp. 2011).

Zmiany intensywności USL dla temperatur regulowanych płynnie w zakresie 4–38°C z szybkością 0,17°C/min przedstawiono na (rys. 7.3). Podwyższano temperaturę – począwszy od 4°C (krzywa wzrostowa), a następnie ją obniżano (krzywa spadkowa). Realizowano w ten sposób pełny cykl zmian temperaturowych. Otrzymana krzywa wzrostowa nie pokrywa się w pełni z krzywą spadkową, co może świadczyć o zmianach w funkcjonowaniu pewnych szlaków metabolicznych, odpowiedzialnych za proces USL. Zmiany te prawdopodobnie zachodzą podczas wzrostu temperatury, gdyż wykres Arrheniusa dla tego przebiegu (rys. 7.4) jest wówczas bardziej nieregularny. Prawdopodobnie w tym czasie w komórkach zachodzą zarówno procesy związane z przystosowywaniem się organizmu do wzrostu temperatury jak i te związane z degradacją pewnych struktur komórkowych. Trzecia kolejna krzywa – wzrostowa (nie pokazana na rysunkach), pokrywa się w granicach błędów pomiarowych z krzywą spadkową. Cały cykl zmian temperaturowych trwał około 7 godz. Energia aktywacji dla fazy spadku temperatury, oszacowana dla temperatur wyższych od 10°C, wynosi 70 kJ/mol.

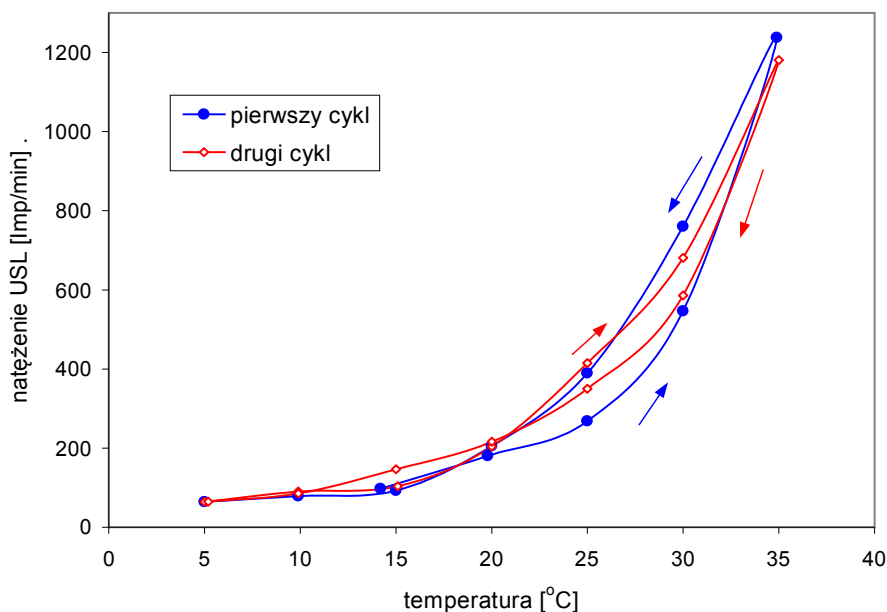


Rys. 7.3. Intensywność USL glonów *Nitellopsis obtusa* (po odjęciu tła aparatury) w funkcji temperatury. Rysunek przedstawia jeden cykl zmian temperatury z szybkością  $0,17^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , obejmujący krzywą wzrostową oraz krzywą spadkową. Pionowe kreski oznaczają odchylenia standardowe dla ośmiu punktów pomiarowych



Rys. 7.4. Wykres Arrheniusa dla wyników przedstawionych na rys. 7.3 sporządzony dla temperatur wyższych od  $10^{\circ}\text{C}$

W innych pomiarach prezentowanych na rysunku 7.5 temperaturę zmieniano szybciej i w sposób skokowy, co 5°C (średnio – 0,25°C/min). Zmieniając temperaturę w granicach 5–35°C wykonano 2 pełne cykle, z których każdy trwał około 4,5 godz.

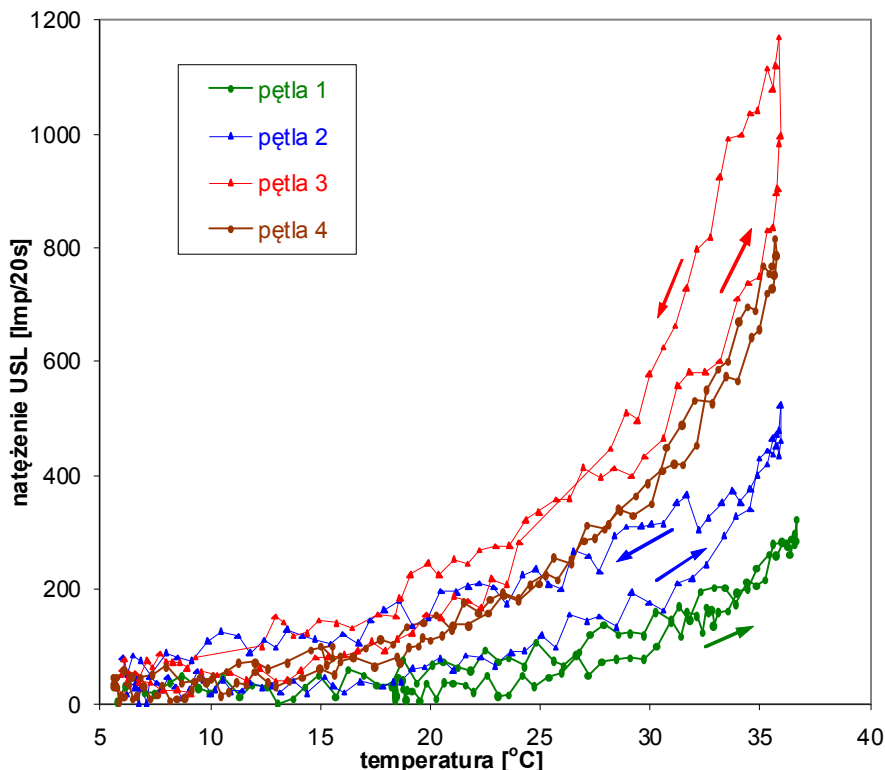


Rys. 7.5. Zmiany natężenia USL komórek *Nitellopsis obtusa* w dwóch cyklach następujących po sobie, w których temperaturę zmieniano o 5°C, co 20 minut. Pierwszy cykl: 14–35–5°C (niebieska linia); drugi cykl: 5–35–5°C (linia czerwona). Każdy punkt stanowi wartość średnią otrzymaną z 10 jednonumutowych pomiarów. Średnie błędy standardowe (w całym zakresie temperatur) mieszczą się w przedziale od 9 do 15 imp/min

Jeżeli pole powierzchni pętli w jednym cyklu potraktuje się jako miarę zaburzenia homeostazy, to można powiedzieć, że podczas drugiego cyklu (węższa pętla) procesy wewnątrzkomórkowe uległy pewnej stabilizacji. Może to stanowić przejaw przystosowania się organizmu do zmienianych temperatur. Energia aktywacji dla całego drugiego cyklu, liczona w zakresie temperatur 10–35°C, wynosi 83 kJ/mol.

Wykonano także pomiary zmian natężenia USL dla podobnego przedziału temperatur, jednakże temperaturę zmieniano w sposób płynny i znacznie szybszy (temperaturę zmieniano nieprzerwanie z szybkością 1,3°C/min przez 4,5 h, uzyskując 6 cykli). Wyniki pomiarów, otrzymane w 4 pierwszych cyklach przedstawiono na rysunku 7.6. W drugim i trzecim cyklu pojawiają się wyraźne

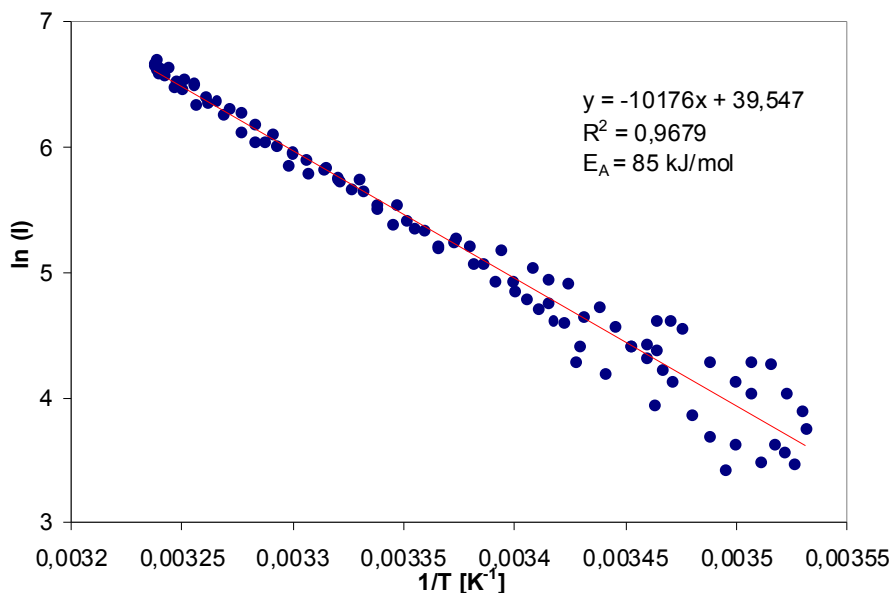
pętle histerezy temperaturowej (krzywe wzrostowe leżą poniżej spadkowych), czemu towarzyszy ogólny wzrost intensywności USL.



Rys. 7.6. Ultraślaba luminescencja (po odjęciu tła) komórek roślin *Nitellopsis obtusa* dla czterech następujących po sobie cykli zmian temperatury z szybkością 1,3°C/min. Pierwszy cykl: 18–36–6°C; następne cykle: 6–36–6°C

W kolejnym, czwartym cyklu nie otrzymano już pętli, a intensywność luminescencji wyraźnie zmalała (w stosunku do cyklu trzeciego). Piąty i szósty cykl, których nie uwzględniono na rysunku, są w swoim kształcie i przebiegu podobne do czwartego. Podobieństwo tych przebiegów wskazuje na wysycenie się zjawiska, czyli zaadaptowanie się komórek roślin Characeae do realizowanych zmian temperaturowych środowiska. Jeśli przyjąć, że pełna adaptacja występuje wówczas, gdy krzywe natężenia USL osiągnęły kształt czwartego – stabilnego cyklu, to oznacza, że adaptacja ma miejsce już wtedy, gdy krzywa spadkowa trzeciego cyklu osiąga temperaturę około 24°C, (tj. po około 2 godz., licząc od początku zmian temperatury).

Energie aktywacji ( $E_A$ ) dla poszczególnych krzywych z rysunku 7.6, zawierają się w przedziale 43–108 kJ/mol (tab. 7.1). Czwarty, stabilny cykl, spełnia dość dobrze równanie Arrheniusa (rys. 7.7), a energia aktywacji dla tego cyklu wynosi 85 kJ/mol. Zmienność  $E_A$  dla trzech pierwszych cykli, świadczyć może o zróżnicowaniu procesów odpowiedzialnych za USL w trakcie realizowanych zmian temperatur.



Rys. 7.7. Wykres Arrheniusa wyników pomiarów USL czwartego cyklu (z rys. 25), dla zakresu temperatur 10–36°C

Do istotnych procesów odpowiedzialnych za USL, dla których  $E_A$  zawiera się w powyższym zakresie wartości, należeć mogą: nieenzymatyczne utlenianie nienasyconych kwasów tłuszczowych ( $E_A = 68$  kJ/mol – Boveris i wsp. 1983), procesy zachodzące w chloroplastach ( $E_A = 98$  kJ/mol – Hideg i wsp. 1990), stowarzyszone z oddychaniem chloroplastów w ciemności (chloro respiracja, Garab i wsp. 1989) jak i procesy związane z transportem elektronów w błonach tylakoidów ( $E_A = 80$ – $90$  kJ/mol – Vass i wsp. 1981). Ten ostatni proces może dominować (podobne wartości  $E_A$ ) w przedziale czasowym, w którym obserwujemy przystosowywanie się badanych roślin do zmian temperatury (wąskie pętle histerezy temperaturowej). Oszacowane dla tego przedziału czasu energie aktywacji wynoszą odpowiednio: 83 kJ/mol (drugi cykl z rys. 7.5) oraz 85 kJ/mol (czwarty cykl z rys. 7.6 i rysunek 7.7).

Obliczone różnice wartości  $E_A$  dla krzywych – wzrostowej i spadkowej w poszczególnych cyklach przedstawiono w tabeli 7.1. Otrzymano relatywnie niskie różnice  $|\Delta E_A|$  dla czwartego cyklu, co może świadczyć o stabilności procesów odpowiedzialnych za USL podczas aklimatyzacji.

Tabela 7.1. Energie aktywacji obliczone na podstawie krzywych z rys.7.6 oraz różnice energii aktywacji w poszczególnych cyklach. Obliczenia wykonano dla temperatur powyżej 10°C

Cykl		czas [min]	$E_A$ [kJ/mol]	$\Delta E_A$ [kJ/mol]
I	wzrost	0 – 18	108	41
	spadek	18 – 39	67	
II	wzrost	39 – 63	86	43
	spadek	63 – 85	43	
III	wzrost	85 – 107	64	-34
	spadek	107 – 129	98	
IV	wzrost	129 – 153	91	14
	spadek	153 – 175	77	

W celu uzyskania informacji jakie procesy odpowiedzialne są za ultrasłabą emisję komórek badanych roślin oraz czy nie zmieniają się one wraz z temperaturą – przeprowadzono badania rozkładu spektralnego USL dla różnych temperatur.

Do pomiarów użyto filtrów granicznych, przepuszczających długofalową część widma. Stosując filtr "cut-off" o granicznej długości fali 715 nm wykonano pomiary dla temperatur 25, 30 i 35°C, zmieniając temperaturę co 1 godzinę. Stwierdzono, że ponad 70% rejestrowanego natężenia USL (350–850 nm) występuje w przedziale długości fal 715–850 nm i jego udział nie zależy od temperatury. Najistotniejszym emiterem w tym przedziale (715–850 nm) jest prawdopodobnie cząsteczka tlenu  $O_2$  w stanie singletowym  $^1\Sigma_g^+$ , która emitując promieniowanie o długości 762 nm, powraca na poziom podstawowy trypletowy  $^3\Sigma_g$ . Istotny udział ma też promieniowanie ultrasłabe chlorofilu. Jednakże ze względu na to, że dla fal krótszych niż 715 nm rejestrowaliśmy tylko około 30 % całkowitej mierzonej emisji, udział chlorofilu nie musi być dominujący, gdyż znaczna część promieniowania chlorofilu

obejmuje zakres długości fali mniejszy niż 715 nm (maksymalna wartość natężenia USL chloroplastów przypada na 720–740 nm – Hideg i wsp. 1990).

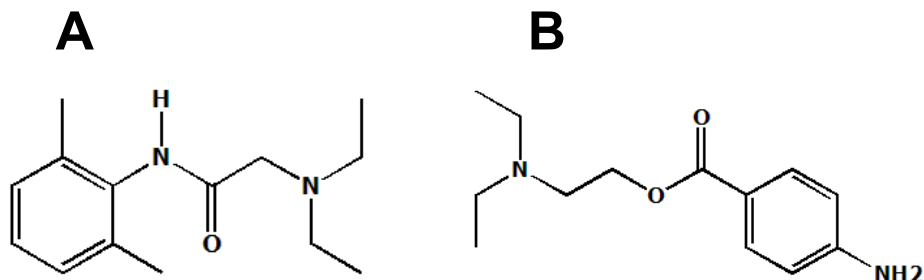
Za powstawanie tlenu singletowego w ciemności najprawdopodobniej odpowiedzialne są procesy wolnorodnikowe zachodzące w komórkach, a w głównej mierze utlenianie reszt wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, wchodzących w skład fosfolipidów – głównych składników budulcowych błon komórkowych (peroksydacja lipidów). Podwyższenie temperatury wzmaga efekty działania stresu oksydacyjnego i tym samym powoduje wzrost peroksydacji lipidów, który może być pośrednio związany z niesprawnością aparatu metabolicznego, indukującego powstawanie wolnych rodników (Kurganova i wsp. 1997, Rao i wsp. 2002). Na przykład utlenianie kwasów tłuszczowych błony mitochondrialnej, może być wywołane niesprawnością systemu transportu elektronów w łańcuchu oddechowym mitochondrium (Cadenas i wsp. 1980, Hideg i wsp. 1991).

Hartowanie organizmu i towarzyszące temu stopniowe zmniejszenie natężenia USL (cykl czwarty poniżej cyklu trzeciego), może być spowodowane przebudową błon polegającą na zwiększeniu udziału nasyconych kwasów tłuszczowych w lipidach błon (Aid i wsp. 1998). Należy jednak zaznaczyć, że przystosowywanie się badanych roślin do zmian temperatury jest zapewne związane z kompleksowymi zmianami reorganizującymi cały aparat metaboliczny, który przystosowuje organizm do funkcjonowania w wysokich temperaturach (termotolerancja).



## 8. Zmiany ultrasłabej emisji fotonowej wywołane przez anestetyki lokalne

Lignokaina i prokaina należą do grupy anestetyków lokalnych (AL), stosowanych w medycynie do miejscowych znieczuleń oraz jako leki arytmiczne (stabilizujące błonę komórkową). Dlatego też najczęstszym aspektem badań tych substancji jest ich oddziaływanie na błony zwierzęcych komórek nerwowych i mięśniowych. Ich działanie związane jest z blokowaniem kanałów w błonie i polega głównie na hamowaniu „dokomórkowego prądu” sodowego, lecz zastosowane w wyższym stężeniu – hamują również przepływ jonów potasowych. Blokowanie kanałów przez anestetyk wiąże się z kolei z osłabieniem lub wyblokowaniem przewodnictwa potencjałów czynnościowych w komórce, bez wyraźnej zmiany potencjału spoczynkowego (Pawełczyk i Zajac s.18–22, 1995). Leki te stosunkowo łatwo rozpuszczają się w lipidach, mogą także wiązać się z białkami (również błonowymi). Cząsteczka lignokainy i prokainy (rys. 8.1), jak większość anestetyków lokalnych, składa się z hydrofobowej reszty aromatycznej, łańcucha środkowego oraz hydrofilnej grupy aminowej. Lignokaina jest lepiej rozpuszczalna w lipidach, stąd też wykazuje silniejsze i dłużej trwające działanie niż prokaina (około 2 razy większa względna siła działania).



Rys. 8.1. Struktura lignokainy – A oraz prokainy – B

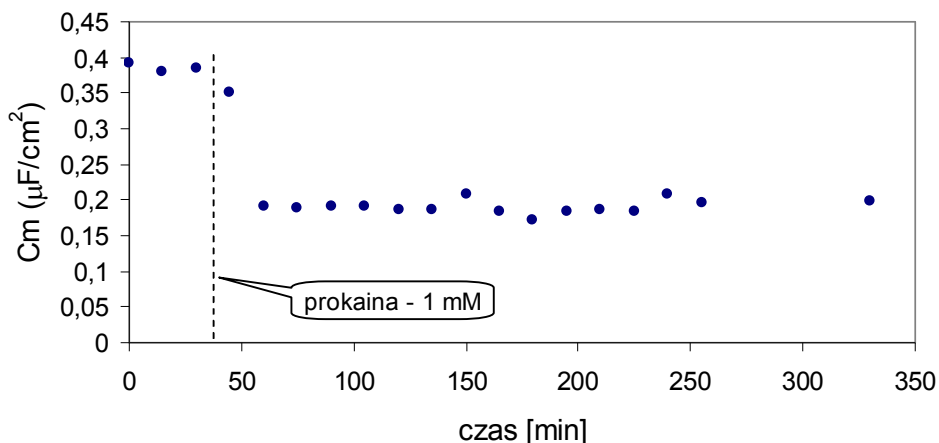
Stosunkowo mało prac poświęcono wyjaśnieniu działania AL na komórki roślinne. Tym bardziej interesujące wydają się być te, poświęcone glonom Characeae.

Obecnie wiadomo, że anestetyki lokalne (głównie prokaina) podane perfuzyjnie z jonami wapnia  $\text{Ca}^{+2}$  do komórek glonów *Nitellopsis obtusa* opóźniają działanie tych jonów na rzecz inaktywacji kanałów chlorkowych (Kataev i wsp. 1988), a 15 mM roztwór prokainy wpływa – u tych roślin – na częstość generowania potencjałów czynnościowych; najpierw ją zwiększając, a następnie (po około 20 min.) powodując jej zmniejszenie (Kazarian i wsp. 1989). Wraz ze

zmianą czasu oddziaływania anestetyka na komórki, zmienia się także kształt potencjału czynnościowego. Roztwór 15 mM prokainy powoduje zmniejszanie amplitudy impulsów oraz wydłużanie się czasu ich narastania i opadania (Kazarian i wsp. 1989). Roztwór 0,1 i 0,5 mM anestetyka tetrakainy powoduje wydłużenie czasu opadania impulsów czynnościowych u *Chara corallina* (Nosaka i wsp. 1992), opór błony komórek *Nitella flexilis* maleje wraz ze wzrostem stężenia prokainy w roztworze (Belton i Van-Netten, 1971), a roztwór 15 mM tego anestetyka powoduje u *Nitellopsis obtusa* gwałtowny spadek oporu błon komórkowych, a następnie stopniowy jego powrót do poziomu ustalającego się nieco poniżej poziomu kontroli (Jaśkowska i wsp. 1989).

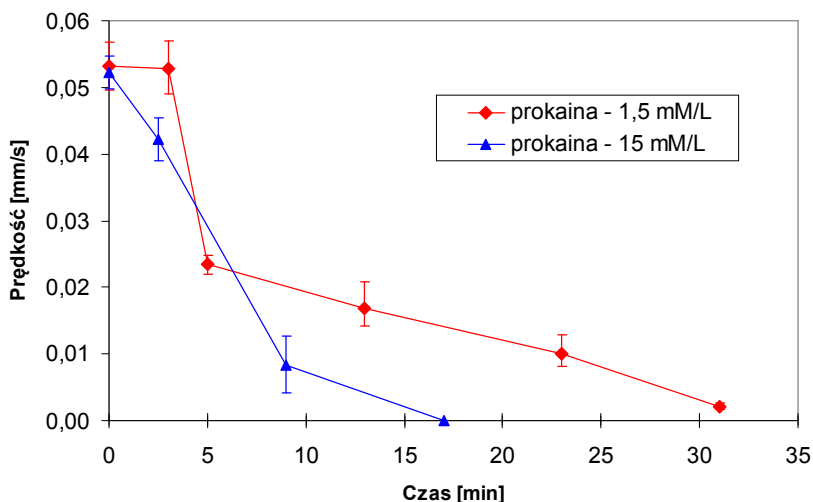
Obserwowano także – wywołane ekspozycją na działanie tych anestetyków – zmiany potencjału spoczynkowego komórek. U *Nitella flexilis* pod wpływem prokainy powstawała niewielka hiperpolaryzacja dla stężeń mniejszych niż 0,1 mM i depolaryzacja dla stężeń większych od 1 mM (Belton i Van-Netten, 1971). W komórkach *Chara corallina*, w badanych roztworach: 0,1 mM tetrakainy, 0,5 mM lignokainy i 1 mM anestetyka bupiwakainy – depolaryzacja potencjału spoczynkowego rosła wraz ze zwiększaniem czasu działania anestetyków. Wzrost stężeń AL do około 0,5 mM powodował wzrost stopnia depolaryzacji, powyżej tego stężenia depolaryzacja stopniowo stabilizowała się (Nosaka i wsp. 1992).

W badaniach komórek *Nitellopsis obtusa* stwierdzono między innymi, że pojemność elektryczna błon komórek w roztworach 1 mM prokainy szybko malała, osiągając stabilizację po około 10 minutach (rys. 8.2). Pomiary przeprowadzono za pomocą elektrod zewnętrznych metodą zmiennoprądowego mostka RC dla prądu o częstotliwości 73 Hz (Żołnierczuk 1971).



**Rys. 8.2.** Przykładowy wynik pomiaru pojemności błony plazmalemmy komórki *Nitellopsis obtusa* po zadaniu 1 mM prokainy

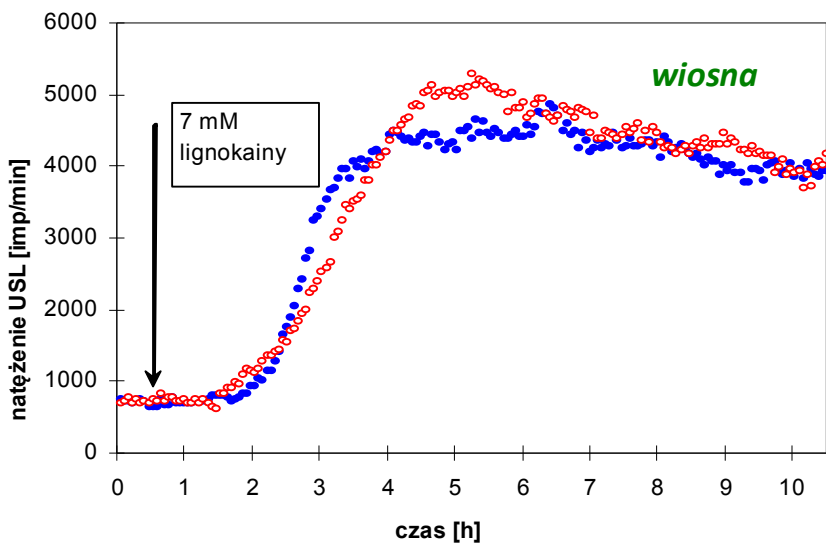
Szybkość ruchu cytoplazmy zmniejszała się bezpośrednio po podaniu prokainy z tym, przy czym dla stężenia 1,5 mM całkowite zatrzymanie cytoplazmy następowało po około 30 minutach, a dla 15 mM – po około 15 minutach (rys. 8.3). Dla roztworu 21 mM lignokainy, ruch cytoplazmy w komórkach międzywęzłowych o długości od 1,1 do 1,3 cm – zatrzymywał się po około 30 minutach i ten przedział czasu wydłużał się wraz ze wzrostem długości komórek.



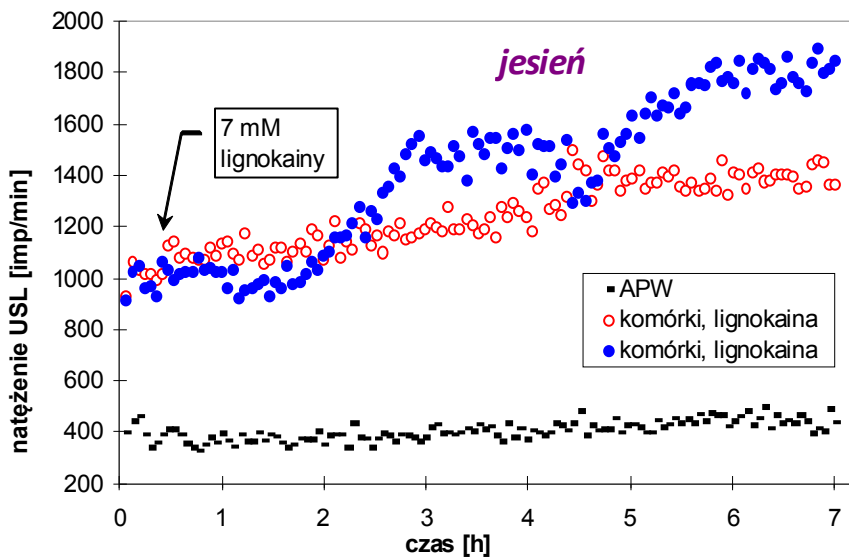
Rys. 8.3. Ruch cytoplazmy w komórkach *Nitellopsis Obtusa* po ekspozycji na działanie prokainy o stężeniach 1,5 oraz 15 mM – średnie z 3 serii pomiarowych. Zadanie anestetyka do roztworu z komórkami nastąpiło zaraz po pierwszym pomiarze

Wiedząc, że anestetyki lokalne mają znaczny wpływ na funkcjonowanie błon komórkowych, co objawia się zmianami ich parametrów (np. elektrycznych i transportowych) – również dla komórek Characeae, wydało się celowe rozszerzenie tych badań o pomiary kinetyki zmian natężenia ultrasłabej luminescencji.

Badania zmian intensywności ultrasłabej luminescencji, wywołanych działaniem lignokainy i prokainy na komórki *Nitellopsis obtusa*, realizowano dodając anestetyk do środowiska APW z roślinami (po 30 komórek międzywęzłowych w próbce). Przy ekspozycji roślin na działanie 7 mM roztworu lignokainy pomiary przeprowadzone w okresie marca i kwietnia, wykazały opóźniony, dość znaczny wzrost intensywności USL, występujący w czasie od 1 do 1,5 godz. po zadaniu biocynnika (rys. 8.4). Obserwowano jednakże przypadki, kiedy reakcja na ten roztwór lignokainy nie była tak oczywista. Np. dla komórek badanych jesienią (o wysokim poziomie emisji własnej) wzrost USL nie był tak zdecydowany i gwałtowny (rys. 8.5). Po zadaniu 1mM roztworu lignokainy znacznych wzrostów natężenia USL nie obserwowano w żadnym sezonie.

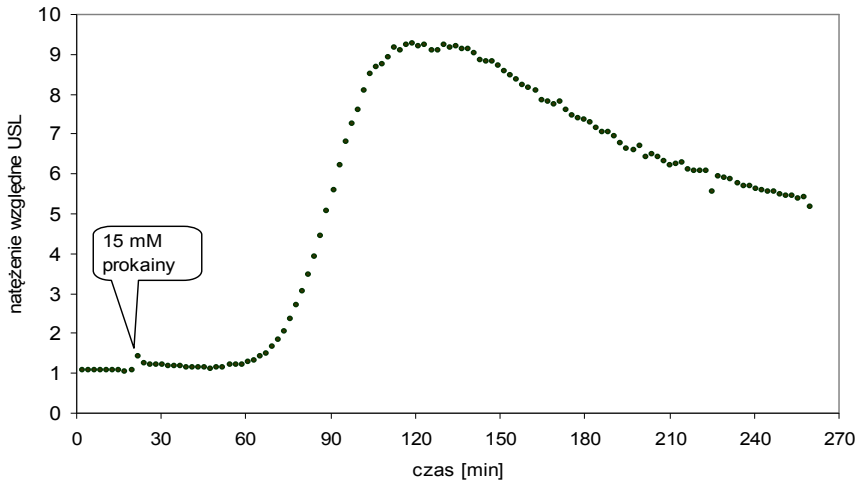


Rys. 8.4. Zmiany natężenia USL dla przykładowych dwóch próbek komórek *Nitellopsis obtusa*, po zadaniu 7 mM roztworu lignokainy (pomiaru wykonano w miesiącach marzec / kwiecień)



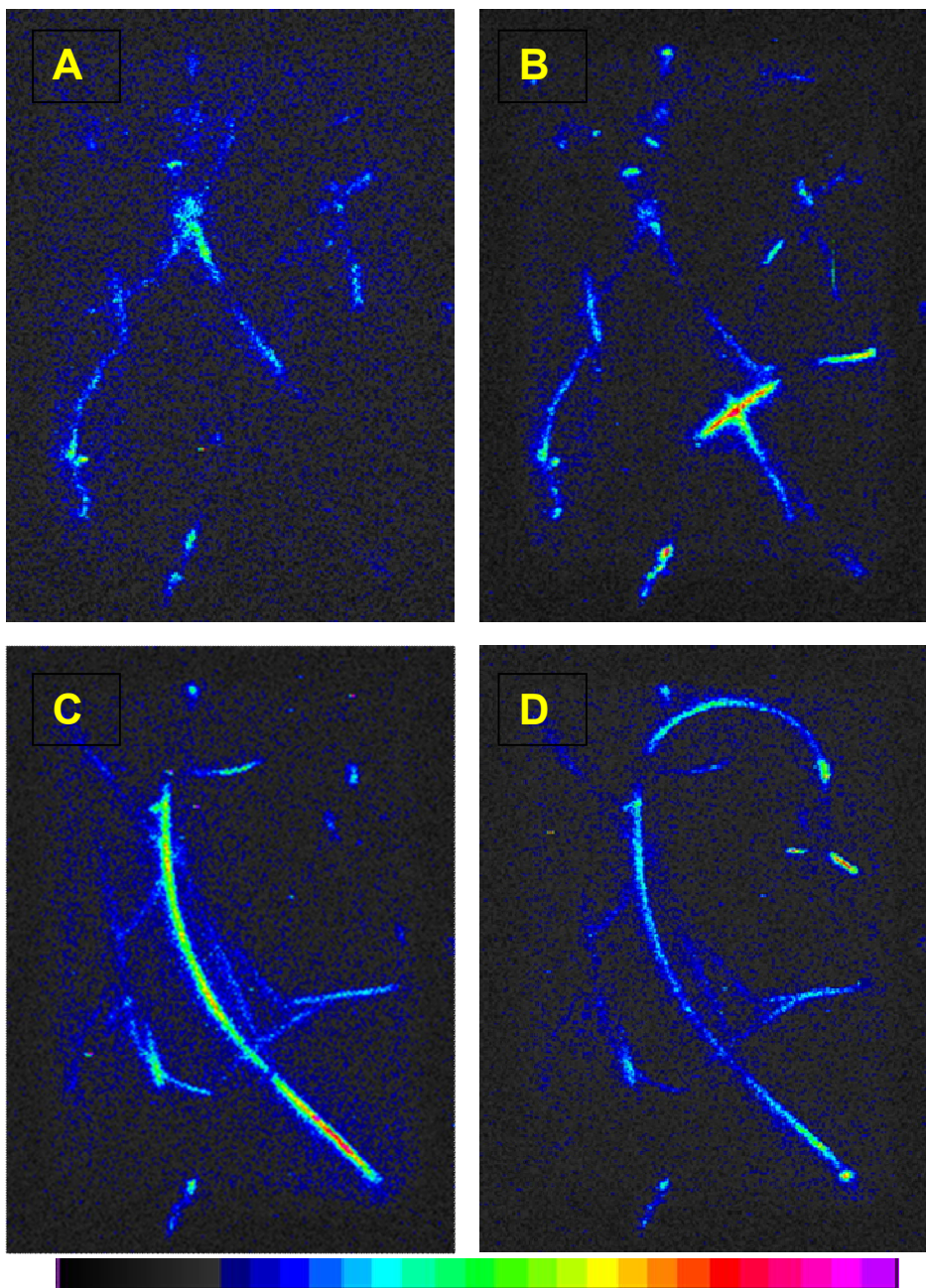
Rys. 8.5. Zmiany natężenia USL dla przykładowych dwóch próbek komórek *Nitellopsis obtusa*, po zadaniu 7 mM roztworu lignokainy (pomiaru wykonano jesienią)

Wykonano także pomiary dla 15 mM roztworu prokainy, która również powodowała opóźniony wzrost natężenia USL, pojawiający się po około 40 min. od zadania bioczynnika (rys.8.6).

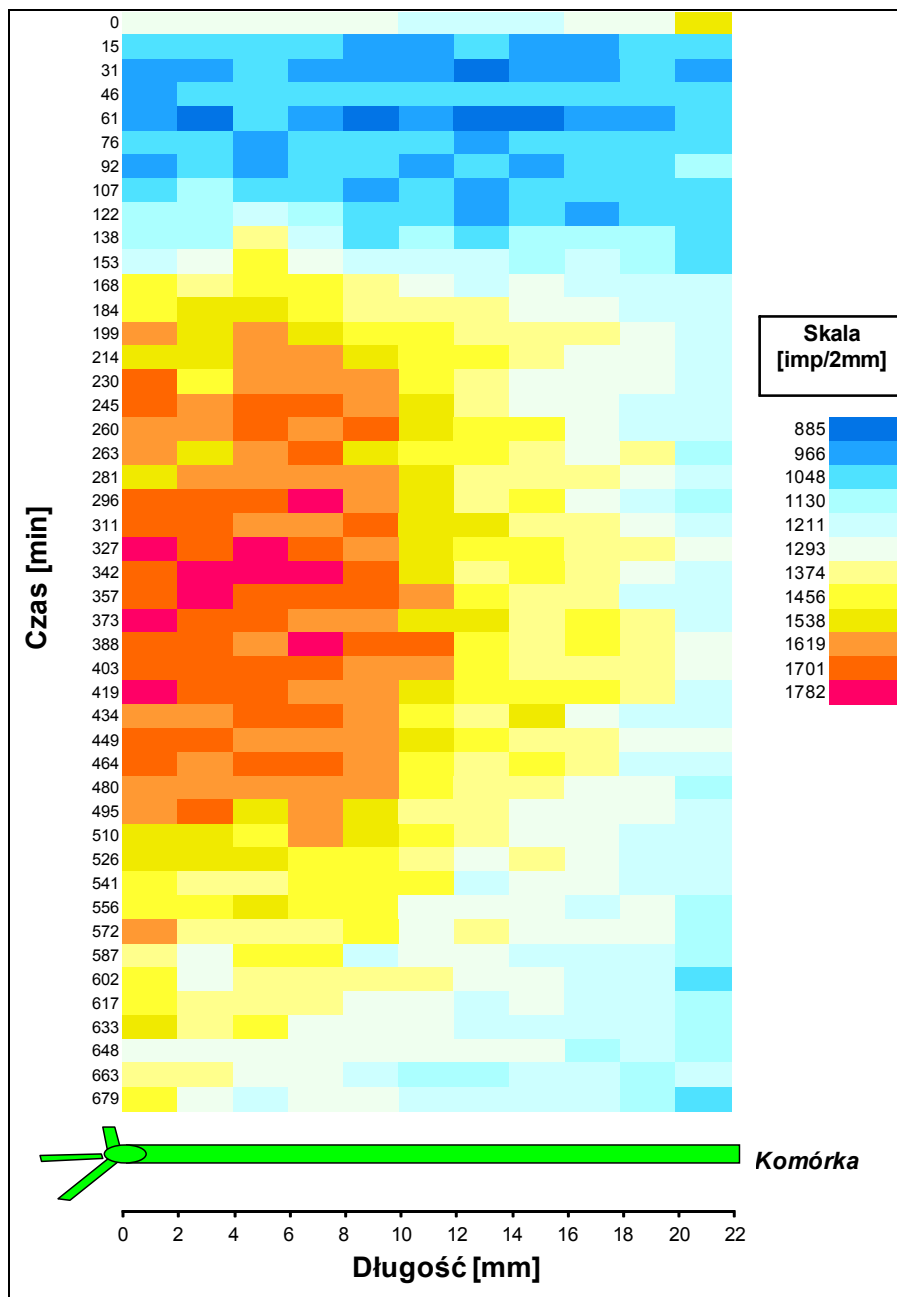


Rys. 8.6. Zmiany natężenia USL dla wartości średnich z 10 próbek komórek *Nitellopsis obtusa*, eksponowanych na działanie 15 mM roztworu prokainy (średnie błędy standardowe stanowią przedział od 6 do 10 % wartości pomiarowych)

Wykonano także obrazowanie luminescencyjne roślin *Nitellopsis obtusa* eksponowanych na działanie 10 mM lignokainy za pomocą aparatury Molecular Light Imager techniką SPCI co przedstawiono w kolejnych obrazach na rysunku 8.7. Po 12 godzinach od wyciemniania uzyskano ultrasłabą emisję fotonową z próbki prezentowaną na obrazku (A). Próbką zawierała kilka komórek. Po podaniu 10 mM lignokainy i akwizycji sygnału przez 15 minut uzyskiwano kolejne obrazy luminescencyjne z próbki przez kilka godzin. Przez okres czasu 1,5 godziny nie obserwowano widocznych zmian w intensywności świecenia. Po tym czasie uzyskano wzrost ultrasłabej emisji, co pokazuje obrazek (B) na rysunku 8.7. Obrazy C i D przedstawiają zmiany przestrzenno-czasowe w intensywności „świecenia” uzyskane odpowiednio po czasie 5 i 6,5 godzin od podania reagenta. Jak można zaobserwować, komórki przejawiają także swoją różną podatność na ten sam bodziec przychodzący ze środowiska, odpowiadając na zadany reagent w różnym czasie w postaci wzmożonej ultrasłabej emisji fotonowej. Idąc krok dalej można było stwierdzić, że nie tylko poszczególne komórki różniły się indywidualną reakcją na bodziec, ale metoda obrazowania czasowo-przestrzennego pozwoliła także zaobserwować, że w obrębie tej samej komórki istnieją różnice w natężeniu luminescencji otrzymywanej z różnych jej części. Są obszary „świecenia” intensywniejsze, np. przy węzłach komórkowych



Rys. 8.7. Obrazy luminescencyjne komórek *Nitellopsis obtusa* – 12 godzin po wyciemnieniu oraz uzyskane po ekspozycji na działanie 10 mM lignokainy, odpowiednio 1,5 – 5 – 6,5 godziny. Czas akwizycji wynosił 15 min. Maksimum luminescencji na skali wynosi 10 zliczeń/piksel (250 zliczeń/ mm<sup>2</sup>)

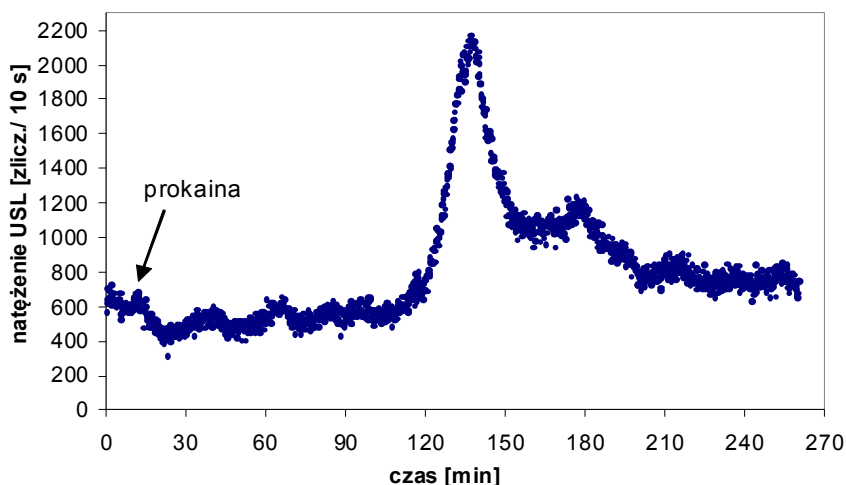


Rys. 8.8. Czasowo-przestrzenne zmiany ultrasłabej luminescencji dla komórki *Nitellopsis obtusa* eksponowanej na działanie 10 mM roztworu lignokainy. Czas akwizycji wynosił 15 min. Zobrazowano liczby zliczeń pochodzących od elementów komórki długości 2 mm. Na osi pionowej podano czas od chwili zadozowania biocynnika

oraz obszary słabszego „świecenia” w innych częściach komórki. Ilustruje to dobrze płaska czasowo-przestrzenna „mapka”, zamieszczona na rysunku 8.8. Wzdłuż osi x wyprostowano wirtualnie badaną komórkę dzieląc ją także wirtualnie na 2-milimetrowe odcinki. Każdy z nich charakteryzuje się odpowiednią wartością natężenia ultrasłabej emisji fotonowej, a tym samym odpowiednią barwą stosownie do zamieszczonej skali. Na osi pionowej jest podany czas w minutach od momentu zadania lignokainy. Ta czasowo-przestrzenna wizualizacja pozwala dokładnie śledzić jak „świeci” każdy dwumilimetrowy odcinek komórki i kiedy rozpoczyna się wzrost natężenia USL. Jest jednak pewien mankament tej metody – mała czasowa zdolność rozdzielcza, gdyż czas akwizycji sygnału w tym eksperymencie wynosił 15 min. Można czas ten ustawić na niższe wartości, jednak ograniczenia wynikają z ilości emitowanych fotonów, których w krótszych przedziałach czasowych jest oczywiście o wiele mniej i sygnał może stać się niemierzalny.

Z analizy rysunku 8.8 nasuwa się konkluzja, że komórki wysyłają silniejsze promieniowanie z miejsc położonych bliżej węzłów komórkowych. Wyjaśnienie tego zjawiska wymaga dalszych jeszcze badań, prawdopodobnie strukturalnych i biochemicznych.

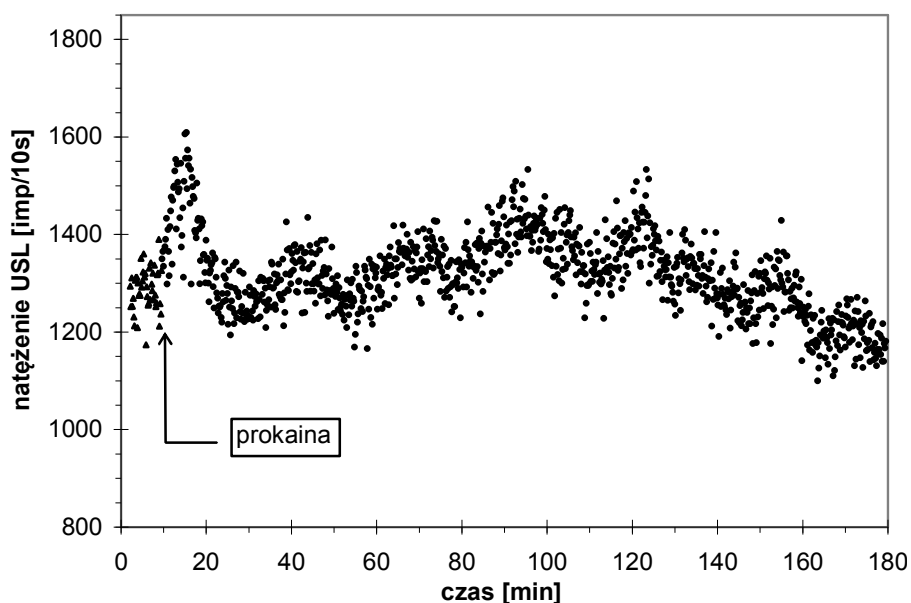
W wielu przypadkach po zadaniu prokainy obserwowano oscylacyjne zmiany natężenia USL (Jaśkowska i wsp. 1999) i to zarówno przed wzrostem intensywności USL jak i po nim (rys. 8.9). Takie zachowanie jest bardziej wyraziste w temperaturach wyższych (np. 30–35°C).



Rys. 8.9. Zmiany natężenia USL dla próbki komórek *Nitellopsis obtusa*, eksponowanych na działanie 15 mM roztworu prokainy (pomiary wykonano w temperaturze 35°C – po ich przeprowadzeniu żadna z komórek nie wykazywała typowych oznak życia) (Jaśkowska i wsp. 1999 – rysunek zmodyfikowany)

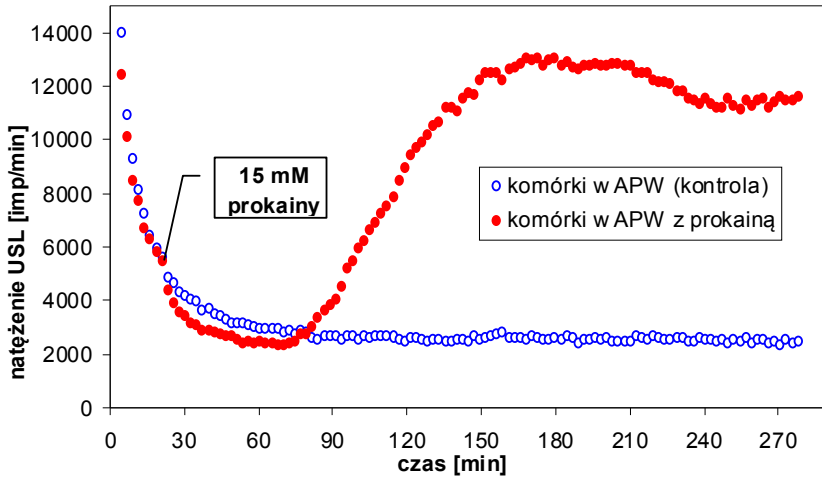


Zmiany intensywności USL typu oscylacyjnego były obserwowane (w temperaturze 30°C) także wtedy, gdy stężenie anestetyka (prokainy) było tak małe, że nie powodowało intensywnego wzrostu natężenia USL w czasie 3 godzin trwania pomiarów (rys. 8.10). Wykonano także pomiary intensywności USL komórek eksponowanych na działanie 15 mM roztworu, w trakcie ich wyświecania. Anestetyk zadawano po 25 minutach od momentu umieszczenia komórek w światłoszczelnej komorze pomiarowej. Oprócz spodziewanego wzrostu intensywności USL, otrzymano wyraźne obniżenie się intensywności wyświecania, bezpośrednio po zadaniu anestetyka (rys. 8.11). Efekt ten był bardziej wyraźny, gdy spadek intensywności wyświecania był łagodniejszy (rys. 8.12).

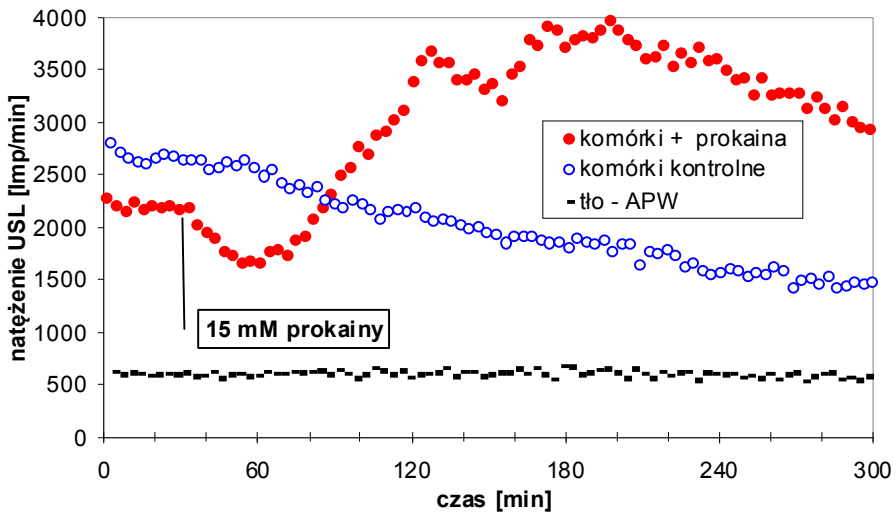


Rys. 8.10. Okresowe zmiany natężenia USL 40 komórek *Nitellopsis obtusa*, eksponowanych na działanie 0,8 mM roztworu prokainy (temperatura próbki 30°C)

Obserwowany spadek intensywności wyświecania można interpretować jako proces gaszenia fosforescencji chlorofilu lub jako przejaw występowania procesów antyoksydacyjnych, generowanych przez anestetyk. O słuszności drugiej tezy, może świadczyć znany efekt działania antyoksydacyjnego zarówno prokainy (Zhang i wsp. 1992), jak i lignokainy (Das i Mistra 1992). Wydaje się, że taki natychmiastowy efekt antyoksydacyjny, może być związany z oddziaływaniem anestetyka na plazmalemę (dla kwasu askorbinowego – antyoksydanta hydrofilowego – efektu „gaszenia” USL w trakcie wyświecania nie obserwowano – patrz rys. 6.16).



Rys. 8.11. Zmiany natężenia USL otrzymane dla przykładowej próbki komórek *Nitellopsis obtusa*, po zadaniu 15 mM prokainy (pomiarzy rozpoczęto po 5 minutach od momentu umieszczenia próbek w światłoszczelnej komorze pomiarowej). Widoczna tendencja spadkowa krzywej natężenia USL dla próbki kontrolnej oznacza trwający jeszcze proces wyświecania



Rys. 8.12. Zmiany natężenia USL komórek *Nitellopsis obtusa*, po zadaniu 15 mM prokainy (widoczna tendencja spadkowa krzywej natężenia USL dla próbki kontrolnej oznacza trwający jeszcze proces wyświecania)

Porównując efekt działania AL na proces ultrasłabej luminescencji, z efektem ich działania na parametry elektryczne plazmalemmy oraz na ruch cytoplazmy, można stwierdzić, że zmiany tych ostatnich zachodzą niemal natychmiast, natomiast zmiany natężenia USL w tym czasie nie występują lub są znikomo małe. Można więc uznać, że biochemiczna reakcja komórek na działanie anestetyka nie prowadzi do wytwarzania dodatkowych stanów elektronowo wzbudzonych. Nie powoduje zatem zmian intensywności USL, natomiast efekt upośledzenia transportu jonowego w błonie, może po pewnym czasie powodować zaburzenie metabolizmu komórkowego, co uwidacznia się erupcją USL, świadczącą o intensyfikacji degradacyjnych reakcji wolnorodnikowych. Można też wysunąć hipotezę, że anestetyk przedostaje się stopniowo przez plazmalemmę i dopiero po pewnym czasie powoduje efekty (w cytoplazmie) związane ze zmianą metabolizmu komórkowego, mające charakter degradacyjny. Tej hipotezy nie potwierdzają jednak wyniki badań zawartości lignokainy w komórkach *Chara corallina*, wskazujące na jej występowanie głównie w plazmalemmie i/lub w ścianie komórkowej (Nosaka i wsp. 1995).

Na podstawie powyższych danych można wnioskować, że zmiany oscylacyjne intensywności USL, obserwowane bezpośrednio po podaniu anestetyka, mogą mieć związek z zaburzeniami funkcjonowania plazmalemmy, związanymi z upośledzeniem transportu jonowego i jej upłynnieniem. Natomiast zmiany oscylacyjne występujące po wzroście intensywności USL, są zapewne związane z procesami degradacyjnymi i letalnymi (porównaj z rys. 7.2). Potwierdzają to obserwacje mikroskopowe komórek prowadzone po wykonaniu pomiarów – u części z nich stwierdzano plazmolizę oraz brak turgoru.

Wykonane badania przeżywalności komórek eksponowanych na działanie prokainy w różnych temperaturach wykazały, że przy takich samych stężeniach anestetyka – przeżywalność komórek spada wraz ze wzrostem temperatury ich środowiska.

## 9. Podsumowanie

Stosowane metody oraz uzyskane rezultaty badań ultrasłabej emisji fotonowej z układów żywych na przykładzie glonów *Nitellopsis obtusa* zostały szczegółowo omówione w kolejnych rozdziałach monografii. Na ich podstawie można sformułować najważniejsze wnioski końcowe:

- 1) Z badań spektralnych ultrasłabej luminescencji (USL) wynika, że głównym emiterym w zakresie długości fal 300–850 nm w komórkach *Nitellopsis obtusa* jest cząsteczka tlenu singletowego sigma oraz jej dimole (przechodzące w podstawowy stan trypletowy). Wysokie natężenie ultrasłabej emisji fotonowej w obszarze „czerwonej” części widma, wydaje się być związane z emisją cząsteczek chlorofilu (absorbującego energię krótkofalowej części widma).
- 2) Działanie anestetyka lokalnego t.j. prokainy wywołuje natychmiastowe efekty antyoksydacyjne, co przejawia się zmniejszeniem intensywności USL, natomiast przy dużych stężeniach anestetyków (prokainy i lignokainy) i po dłuższym czasie ekspozycji indukują one działanie letalne i towarzyszące temu reakcje prooksydacyjne.
- 3) Podawany egzogenie – do środowiska komórek – kwas askorbinowy (antyoksydant hydrofilowy), wywołuje reakcje prooksydacyjne oraz intensyfikuje oddychanie mitochondrialne (procesom tym towarzyszy wzrost intensywności USL). Wzrost natężenia USL indukują także podawane do frakcji komórkowych antyoksydanty hydrofobowe, t.j. alfa-tokoferol i beta-karoten.
- 4) Działanie kwasu askorbinowego na frakcję rybosomalną prowadzi do obniżenia intensywności USL, co wydaje się potwierdzać antyoksydacyjne, a więc ochronne działanie AsA także wobec molekuł RNA i DNA.
- 5) Spośród badanych frakcji strukturalnych komórek, najdłużej trwającą akumulacją energii świetlnej charakteryzują się chloroplasty (wyświetlanie z frakcji komórek *Nitellopsis Obtusa* zawierającej chloroplasty trwa najdłużej).
- 6) Zdecydowanie większą intensywność USL wykazują komórki badane w okresie jesiennym. Wskazuje to na zmianę charakteru procesów metabolicznych, a także większą zawartość wolnych rodników w komórkach starszych w stosunku do komórek z okresu wiosennego.
- 7) U około 10% części populacji komórek *Nitellopsis obtusa* stwierdzono oscylacyjny charakter zmian procesów metabolicznych, związanych z generowaniem USL (taka sama część badanych komórek wykazywała oscylacyjny charakter zmian właściwości transportowych oraz podstawowych parametrów elektrycznych błon komórkowych).

- 8) Wykrywane sumaryczne zmiany oscylacyjne ultrasłabej luminescencji próbek, złożonych z kilkudziesięciu komórek, mogą oznaczać synchronizację ich zachowań na drodze nieznanego dotąd rodzaju komunikacji – za najbardziej prawdopodobną uważa się komunikację fotonową.
- 9) Cykliczne zmiany temperatury wywołują zaburzenie homeostazy komórek. Otrzymywane „pętle histerezy temperaturowej” w następujących po sobie cyklach pomiarowych mogą stanowić miarę zaburzenia homeostazy, ale również wskazywać na stopniowe adaptowanie się komórek do zmian temperatury.
- 10) Oddziaływanie czynników chemicznych i fizycznych na poziomie zmian subletalnych i letalnych wywołuje w komórkach reakcje obronne, przejawiające się w formie rytmicznych zmian procesów oksydacyjnych. Uwidacznia się to poprzez oscylacyjny charakter zmian natężenia ultrasłabej emisji fotonowej.
- 11) Zastosowana metoda badań (zliczania pojedynczych fotonów – SPC) nie jest bezpośrednim sposobem testowania stanów funkcjonalnych komórek, jednak ze względu na swą nieinwazyjność można stosować ją *in vivo*. Za jej pomocą można również monitorować zmieniające się dynamicznie stany funkcjonalne komórek zaburzonych oddziaływaniami egzogennymi i endogennymi, a w sprzężeniu z metodami biochemicznymi dociekać jakie procesy są powodem tych zmian.
- 12) Zastosowanie metody obrazowania luminescencyjnego (Single Photon Counting Imaging – SPCI) umożliwiło zaobserwowanie niejednoczesnych reakcji poszczególnych komórek glonów na czynniki stresogenne, a nawet różnorodne reakcje na bodziec przez poszczególne części tej samej komórki. Poprzez zastosowanie tej metody wykryto także wzmożoną ultrasłabą emisję fotonową z miejsc roślin, które uległy uszkodzeniom. Ten fakt czyni stosowaną metodę bardzo perspektywiczną – także w aspekcie diagnozowania medycznego.

## Bibliografia

- Abeles F.R., *Plant chemiluminescence*, „Annual Review of Plant Physiology” 1986, vol. 37, s. 49–72.
- Aid F., Kesri-Benhassaine G., Demandre C., Mazliak P., *Modification of the biosynthesis of rape lipid molecular species by heat shock*, „Phytochemistry” 1998, vol. 47, s. 1195–1200.
- Andjus P.R., Popović O., Sarvazyan N., Sarvazyan N., Živić M., Vučelić D., *Effects of ion transport inhibitors on D<sub>2</sub>O induced action potential in Characeae*, „Plant Science” 1997, vol. 128, s. 121–129.
- Bajpai R.P., Bajpai P.K., *Light induced biophotonic emission from plant tissues*, „Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence” 1992, vol. 7, s. 177–184.
- Bajpai R.P., Kumar S., Sivadasan V.A., *Biophoton emission in the evolution of a squeezed state of frequency stable damped oscillator*, „Applied Mathematics and Computation” 1998, vol. 93, s. 277–288.
- Baskakov I.V., Voyeikov V.L., *Temperature dependence of chemiluminescence in aqueous aspartate solutions in the presence of hydrogen peroxide and ethidium bromide*, „Biophysics” 1995, vol. 40, 1149–1157.
- Beilby M.J., Cherry C.A., Shepherd V.A., *Dual turgor regulation response to hypotonic stress in Lamprothamnium papulosum*, „Plant Cell and Environment” 1999, vol. 22, s. 347–359.
- Belton P., Van-Netten C., *The effects of pharmacological agents on the electrical responses of cells of Nitella flexilis*, „Canadian Journal of Physiology and Pharmacology” 1971, vol. 49, s. 824–832.
- BERTHOLD TECHNOLOGIES NIGHTOWL – <http://www.mercado-ideal.com/catalogosb/BERTHOLD%20TECHNOLOGIES%20NIGHTOWL.pdf> [dostęp 12 grudnia 2015].
- Birtic S., Ksas B., Genty B., Mueller M.J., Triantaphylidès C., Havaux M., *Using spontaneous photon emission to image lipid oxidation patterns in plant tissues*, „Plant Journal” 2011, vol. 67 s. 1103–1115.
- Blatt F.J., *Temperature dependence of the action potential in Nitella flexilis*, „Biochimica et Biophysica Acta” 1974, vol. 329, s. 382–389.
- Böhm J., Untersuchungen der ultraschwachen Photonenemission von Pflanzenkeimlingen unter dem Einfluss von Magnetfeldern und Temperaturveränderungen. Diplomarbeit (Experimental Physik), University of Marburg, 1980.
- Borc R., Dudziak A., Jaškowska A., *Ultraweak luminescence of the Characeae plants under the circumstances of cyclical changes in temperature*, „Current Topics in Biophysics” 2011, vol. 34, s. 37–44.

- Bors W., Buettner G.R., *The vitamin C radical and its reactions*, [W]: Vitamin C in Health and Disease, pod red. Lester Packer i Jürgen Fuchs, New York, Marcel Dekker Inc., 1997, s. 75–94.
- Boveris A., Varsavsky A.I., Gonçalves J., Sánchez R.A., *Chemiluminescence of soybean seeds: spectral analysis, temperature dependence and effect of inhibitors*, „Photochemistry and Photobiology” 1983, vol. 38, s. 99–104.
- Bowler C., Van Montagu M., Inzé D., *Superoxide dismutase and stress tolerance*, „Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology” 1992, vol. 43, s. 83–116.
- Breithaupt H. *Biological rhythms and communication*, [W:] Electromagnetic Bio-Information, Proceedings of the Symposium, Marburg, September 5, 1977, pod red. F.A. Popp, G. Becker, H.L. König, W. Peschka, Munchen, Urban & Schwarzenberger, 1977, s. 1–24.
- Cadenas E., *Biological chemiluminescence*, „Photochemistry and. Photobiology” 1984, vol. 40, s. 823–830.
- Cadenas E., Boveris A., Chance B., *Low-level chemiluminescence of bovine heart submitochondrial particles*, „Biochemical Journal” 1980, vol. 186, s. 659–667.
- Cadenas E., *Lipid peroxidation during the oxidation of hemoproteins by hydroperoxides. Relation to electronically excited state formation*, „Journal of Bioluminescence and. Chemiluminescence” 1989, vol 4, s. 208–218.
- Carotenoids: Biosynthesis and Metabolism*, vol. 3, red. G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander, Basel, Birkhäuser, 1998.
- Chen W.L., Xing D., Tan S.C., Tang Y.H., He Y., *Imaging of ultra-weak biochemiluminescence and singlet oxygen generation in germinating soybean in response to wounding*, „Luminescence” 2003, vol. 18, s. 37–41.
- Chwirot B.W., *Do we always need to know molecular origin of light emitted by living systems?*, [W:] Biophotons, pod red. J.J. Chang, J. Fisch, F.A. Pop, Dordrecht. Kluwer Academic Publishers, 1998, s. 229–237.
- Cifra M., Pospíšil P., *Ultra-weak photon emission from biological samples: definition, mechanisms, properties, detection and applications*, „Journal of Photochemistry and Photobiology B” 2014, vol. 139, s. 2–10.
- Cifra, M., Fields, J.Z., Farhadi, A., *Electromagnetic Cellular Interactions*, „Progress in Biophysics and Molecular Biology”, 2011 vol. 105, s. 223–246.
- Cilento G., Adam W., *From free radicals to electronically excited species*, „Free Radical Biology and Medicine” 1995, vol. 19, s. 103–114.
- Cilento G., *Photobiochemistry without light*, „Experientia” 1988, vol. 44, s. 572–576.
- Colli L., Facchini U., Guidotti G., Dugnani-Lonatti R., Orsenigo M., Sommariva O., *Further measurements on the bioluminescence of the seedlings*, „Experientia” 1955, vol. 11, s. 479–481.

- Colli L., Facchini U., *Light emission by germinating plants*, "Nuovo Cimento" 1954, vol. 12, s. 150–153.
- Dąbbska I., Karpiński J., *Ramienice. „Klucz do oznaczania gatunków krajowych*, Warszawa, PWN, 1954.
- Das K.C., Misra H.P., *Lidocaine: a hydroxyl radical scavenger and singlet oxygen quencher*, „Molecular and Cellular Biochemistry” 1992, vol. 115, s. 179–185.
- De Mello M.P., Nascimento A.L.T.O., Bone C., Cilento G., *Excitation of chloroplasts in Euglena gracillis in the absence of light*. „Photochemistry and Photobiology” 1988, vol. 47, s. 457–461.
- Deby-Dupont G., Deby C., Mouithys-Mickalad A., Hoebeke M., Mathy-Hartert M., Jadoul L., Vandenberghe A., Lamy M., *The antibiotic ceftazidime is a singlet oxygen quencher as demonstrated by ultra-weak chemiluminescence and by inhibition of AAP consumption*. „Biochimica et Biophysica Acta” 1998, vol. 1379, s. 61–68.
- Demidchik V.V., Naidun S.N., Yablontskaya L.I., Sokolik A.I., Yurin V.M., *Alteration of ion channels in the plasmalemma of Nitella flexilis cells during long-term hyperthermia*, „Russian. Journal of Plant Physiology” 2001, vol.48, s. 294–299.
- Devaraj B., Scott R.O., Roschger P., Inaba H., *Ultraweak light emission from rat liver nuclei*, "Photochemistry and Photobiology" 1991, vol. 54, s. 289–293.
- Djurisić M.R., Andjuz P.R., *Temperature sensitivity of the tonoplast  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channel in Chara: the influence of reversing the sign of membrane potential*, „Journal of Membrane Biology” 2000, vol. 178, s. 215–224.
- Ducruet J-M., Vass I. *Thermoluminescence: experimental*. „Photosynthesis Research” 2009, vol. 101, s. 195–204.
- Dudziak A., Jaśkowska A., Borc R., Śpiewła E., *Oxygen consumption in relation to ultraweak luminescence of Characeae cells induced by ascorbic acid*, „Current Topics in Biophysics” 2001, vol. 25, s. 89–93.
- Edmunds L.N., *Cellular and molecular bases of biological clocks*, New York, Springer Verlag, 1988.
- Elias M., Wieczorek G., Rosenne S., Tawfik D.S., *The universality of enzymatic rate-temperature dependency*, „Trends in Biochemical Sciences” 2014, vol. 39, s. 1–7.
- Ellis R.J., Wright A.G., *Optimal use of photomultipliers for chemiluminescence and bioluminescence applications*, „Luminescence” 1999, vol. 14, s. 11–18.
- Fedorova G.F., Trofimov A.V., Vasil’ev R.F., Veprintsev T.L., *Peroxy-radical mediated chemiluminescence: mechanistic diversity and fundamentals for antioxidant assay*, „Archive for Organic Chemistry” 2007, VIII, s. 163–215.



- Feist M., Grambast-Fessard N., Guerlesquin M., Karol K., Huima L., Qifei W., Shenzen Z. w: *Treatise on Invertebrate Paleontology, Part B, Proctostista (Charophyta)*, 2005, vol. 1 (R. Kaesler, Ed.). The Geological Society of America & the University of Kansas, Boulder and Laurence.
- Fernández-Aláez M., Fernández-Aláez C., Rodríguez S., *Seasonal changes in biomass of charophytes in shallow lakes in the northwest of Spain*, „Aquatic Botany” 2002, vol. 72, s. 335–348.
- Fijałkowski D., *Szata roślinna jezior Łęczyńsko-Włodawskich i przylegających do nich torfowisk*, „Annales UMCS Sectio B” 1959, vol. 14, s. 131–206.
- Fisahn J., Mikschl E., Hansen U.P., *Separate oscillations of the electrogenic pump and  $K^+$ -channel in Nitella as revealed by simultaneous measurements of membrane potential and of resistance*, „Journal of Experimental Botany” 1986, vol. 37, s. 34–47.
- Fröhlich H., *Evidence for coherent excitations in biological systems*, „International Journal of Quantum Chemistry” 1983, vol. 23, s. 1589–1595.
- Fröhlich H., *Long range coherence and energy storage in biological systems*, „International Journal of Quantum Chemistry” 1968, vol. 2, s. 641–649.
- Galle M., Neurohr R., Altmann G., Popp F.A., Nagl W., *Biophoton emission from Daphnia magna: A possible factor in the self-regulation of swarming*, „Experientia” 1991, vol. 47, s. 457–460.
- Gallep C.M., *Ultraweak, spontaneous photon emission in seedlings: toxicological and chronobiological applications*, „Luminescence” 2014, vol. 29, s. 963–968.
- Garab Gy., Lajkó F., Mustárdy L., Márton L., *Respiratory control over photosynthetic electron transport in chloroplasts of higher-plant cells: evidence for chlororespiration*, „Planta” 1989, vol. 179, s. 349–358.
- Gędziorowska D., *Izolacja bałtyckich glonów jednokomórkowych i uzyskanie kultur akseńicznych dla badań fizjologiczno-biochemicznych*, „Studia i Materiały Oceanologiczne PAN” 1983, vol. 41, s. 222–226.
- Godlewski M., Rajfur Z., Sławiński J., Kobayashi M., Usa M., Inaba H., *Spectra of the formaldehyde-induced ultraweak luminescence from yeast cells*, „Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology” 1993, vol. 21, s. 29–35.
- Goltsev V., Zaharieva I., Chernev P., Strasser R.J., *Delayed fluorescence in photosynthesis*, „Photosynthesis Research” 2009, vol. 101, s. 217–232.
- Gorączko W., Sławiński J. 2004 *Secondary Ultraweak Luminescence from Humic Acids Induced by  $\gamma$ -Radiation*. „Nonlinearity in Biology, Toxicology, Medicine” vol. 2 s. 245–258.
- Górski Z., Bebnista T., Floryszak-Wieczorek J., Domański M., Sławiński J., *Computer-aided photometric analysis of dynamic digital bioluminescent images.*, „Proceedings of SPIE” 2002, vol. 5064, s. 1–10.

- Górski Z., Sławiński J., *Use of a CCD-monitored chemiluminescence imaging for sensing of the UV – and ozone-induced degradation of humus substances*, „Proceedings of SPIE” 2002, vol. 4887, s. 23–31.
- Grasso E., Musumeci F., Triglia A., Pagano M., *Spectra of photons emitted from germinating seeds*, „Il Nuovo Cimento D” 1991, vol. 13, s. 891–897.
- Gu Q., Popp F.A., *Nonlinear response of biophoton emission to external perturbations*, „Experientia” 1992, vol. 48, s. 1069–1082.
- Gurvitsch A.G., Grabje S., Salkind S., *Die natur des spezifischen erregers der zellteilung*, „Archive für Entwicklung und Mechanik” 1923, vol. 100, s. 11–40.
- Haddock S.H.D., Moline M.A., Case J.F., *Bioluminescence in the Sea*, „Annual Review of Marine Science”, 2010 vol. 2, s. 443–93.
- Havaux M., *Spontaneous and thermoinduced photon emission: new methods to detect and quantify oxidative stress in plants*, „Trends in Plant Science” 2003, vol. 8, s. 409–413.
- He Y., Tang Y., Zhong X., Tan S., Xing D., *Image observation of ultraweak biophoton emission from animal wound tissue and tumor tissue*, „Proceedings of SPIE” 1999, vol. 3863, s. 134–137.
- Hertel A., Steudle E., *The function of water channels in Chara: The temperature dependence of water and solute flows provides evidence for composite membrane transport and for a slippage of small organic solutes across water channels*, „Planta” 1997, vol. 202, s. 324–335.
- Hideg E., Kobayashi M., Inaba H., *Delayed Fluorescence and Ultraweak Light Emission from Isolated Chloroplasts (Comparison of Emission Spectra and Concentration Dependence)*, „Plant and Cell Physiology” 1992, vol. 33, s. 689–693.
- Hideg É., Kobayashi M., Inaba H., *Spontaneous ultraweak light emission from respiring spinach leaf mitochondria*, „Biochimica et Biophysica Acta” 1991, vol. 1098, s. 27–31.
- Hideg É., Scott R.Q., Inaba H., *High resolution emission spectra of one second delayed fluorescence from chloroplasts*, „FEBS Letters” 1989, vol. 250, s. 275–279.
- Hideg E., Scott R.Q., Inaba H., *Spectral resolution of long term (0.5–50 s) delayed fluorescence from spinach chloroplasts*, „Archives of Biochemistry and Biophysics” 1991, vol. 285, s. 371–372.
- Hideg É.; Kobayashi M., Inaba H., *Ultraweak photoemission from dark-adapted leaves and isolated chloroplasts*, „FEBS Letters” 1990, vol 275, s. 121–124.
- Hogg J., Williams E.J., Johnston R.S., *The temperature dependance of the membrane potential and resistance in Nitella translucens*, „Biochimica et Biophysica Acta” 1968, vol. 150, s. 640–648.
- Hollaender A., Klaus W., *An experimental study of the problem of mitogenic radiation*, „Bulletin of National Research Council” 1937, vol. 100, s. 3–96.

- Hossu M., Ma L., Chen W., *Nonlinear enhancement of spontaneous biophoton emission of sweet potato by silver nanoparticles*, „Journal of Photochemistry and Photobiology B” 2010, vol. 99, s. 44–48.
- Hossu M., Ma L., Zou X., Chen W., *Enhancement of biophoton emission of prostate cancer cells by Ag nanoparticles*, „Cancer Nanotechnology” 2013, vol. 4, s. 21–26.
- Hung L.S., Chen C.H., *Recent progress of molecular organic electroluminescent materials and devices*, „Materials Science and Engineering R” 2002, vol. 39, s. 143–222.
- Ichimura T.M., Hiramatsu M., Hirai N., Hayakawa T., *Two-dimensional imaging of ultraweak emission from intact soybean roots*, „Photochemistry and Photobiology” 1989, vol. 50, s. 283–286.
- Inaba H., *Photonic sensing technology is opening new frontiers in biophotonics*, „Optical Review” 1997, vol. 4, s. 1–10.
- Inaba H., *Super-high sensitivity systems for detection and spectral analysis of ultraweak photon emission from biological cells and tissues*, „Experientia” 1988, vol. 44, s. 550–559.
- Inoue Y., *Photosynthetic thermoluminescence as a simple probe of photosystem II electron transport*, [W:] *Biophysical Techniques in Photosynthesis*, pod red. J. Amesz i A.J. Hoff, The Netherlands, Kluwer Academic Publishers, 1996, s. 93–107.
- Integrative biophysics: biophotonics*, red. F.A. Popp, L. Belousov, Springer Netherlands, 2003.
- Isoshima T., Isojima Y., Hakomori K., Kikuchi K., Nagai K., Nakagawa H., *Ultrahigh sensitivity single-photon detector using a Si avalanche photodiode for the measurement of ultraweak biochemiluminescence*, „Review of Scientific Instruments” 1995, vol. 66, s. 2922–2926.
- Ives J.A., van Wijk E.P.A., Bat N., Crawford C., Walter A., Jonas W. B., van Wijk R., Greef J., *Ultraweak photon emission as a non-invasive health assessment: A systematic review*, „PLoS One” 2014, vol. 9, e87401.
- Iyozumi H., Kato K., Makino T., *Spectral Shift of Ultra-weak photon emission from sweet potato during a defense response*, „Photochemistry and Photobiology” 2002, vol. 75, s. 322–325.
- Jaśkowska A., Borc R., Dudziak A., Milczarek I., Spiewla E., *Ultraweak biochemiluminescence of dark-adapted Characeae cells*. „Current. Topics in Biophysics” 2001a, vol. 25, s. 95–101.
- Jaśkowska A., Borc R., Dudziak A., Śpiewla E., *Oscillatory character of changes in ultraweak luminescence from Nitella cells*. „Acta Societatis Botanicorum Poloniae” 1999, vol. 68, s. 281–285.
- Jaśkowska A., Borc R., Milczarek I., Dudziak A., Śpiewla E., *Kinetics studies of ultraweak luminescence induced by ascorbic acid in the Characeae cells and in their structures*, „Luminescence” 2001b, vol. 16, s. 51–56.

- Jaśkowska A., Tokarska M., Kazarian G.T., Śpiewła E., *Wpływ prokainy na zmiany oporu elektrycznego błon komórkowych Characeae*, „Prace Naukowe PL-Fizyka” 1989, vol. 184(6), s. 83–93.
- Jursinic P.A., *Delayed fluorescence: current concepts and status*, [W:] Light emission by plants and bacteria, pod red. J.A. Govindji, D.A. Forg, New York: Academic Press, 1986, s. 291–238,
- Kai S., Mitani T., Fujikawa M., Anomalous biophoton emission during germination process of red bean, „Japanese Journal of Applied Physics part 2 letters” 1993, vol. 32, s. 1417–1419.
- Kalbhen D.A., *Introductory remarks on problems of chemiluminescence in liquid scintillation counting*, [W:] Liquid scintillation counting. Recent Applications and Development, – Sample preparation and applications, pod red. C.T. Pehg, D.L. Horrocks, E.L. Alpen, New York, Academic Press, 1980, vol. 2: s. 273–280.
- Karbowski L.M., Murugan N.J., Dotta B.T., Persinger M.A., *Only 1% Melanoma Proportion in Non-Malignant Cells Exacerbates Photon Emissions: Implications for Tumor Growth and Metastases*. „International Journal of Cancer Research and Molecular Mechanisms” 2015, vol. 1(2): doi <http://dx.doi.org/10.16966/2381-3318.108>
- Karczmarz K., *Strefowość rozmieszczenia ramienic w głębokich jeziorach krasowych na Pojezierzu Łęczyńsko-Włodawskim*, „Annales UMCS Sectio C” 1980, vol. 35, s. 43–52.
- Karczmarz K., *Sukcesja zespołów i występowanie ramienic na Pojezierzu Łęczyńsko-Włodawskim*, „Annales UMCS Sectio C” 1975, vol. 30, s. 113–118.
- Kasperkovitz D.A., *Two-phase plasma-coupled static shift register*, „IEEE Journal of Solid-State Circuits” 1975, vol. 10, s. 143–151.
- Kataev A.A., Zherelova O.M., Berestovskii G.N., *The effect of charged local anesthetics on the inactivation of Ca<sup>2+</sup>-activated Cl<sup>-</sup> channels of Characean algae*. „Biofizika” 1988, vol. 33, s. 1006–1012 (w j. ros.).
- Kazarian G.T., Jaśkowska A., Tokarska M., Żołnierczuk R., Śpiewła E., *Zmiany pobudliwości komórek Nitellopsis obtusa wywołane działaniem prokainy*, „Prace Naukowe PL – Fizyka”, 1989, vol. 184(6), s. 51–65.
- Kim H., Ahn S., Kim J., Soh K.S., *Enhancement of ultraweak photon emission with 3MHz ultrasonic irradiation on transplanted tumor tissues of mice*, „Ultrasonics - Sonochemistry” 2008, vol. 15(5), s. 921–926.
- Kim J.D., Lim J., Sung B., Soh K.S. *Biophoton Emission from Rat Liver*, „Journal of the Korean Physical Society” 2003, vol. 42, s. 427–430.
- Kinne-Safran E., Kinne R.K.H., *Membrane isolation: strategy, techniques, markers*. „Methods of Enzymology” 1989, vol. 172, s. 3–17.
- Kobayashi K., Okabe H., Kawano S., Hidaka Y., Hara K., *Biophoton emission induced by heat shock*. „PLoS ONE” 2014, vol. 9, e105700.

- Kobayashi M., Devaraj B., Usa M., Tanno Y., Takeda M., Inaba H., *Development and application of new technology for two-dimensional space-time characterization and correlation analysis of ultraweak biophoton Information*, „Frontiers of Medical and Biological Engineering” 1996, vol. 7, s. 299–309.
- Kobayashi M., Devaraj B., Usa M., Tanno Y., Takeda M., Inaba H., *Two-dimensional imaging of ultraweak photon emission from germinating soybean seedlings with a highly sensitive CCD camera*, „Photochemistry and Photobiology” 1997, vol. 65, s. 535–537.
- Kobayashi M., *Highly sensitive imaging for ultra-weak photon emission from living organisms*, „Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology” 2014, vol. 139, s. 34–38.
- Kobayashi M., Takeda M., Sato T., Yamazaki Y., Kaneko K., Ito K.-I., Kato H., Inaba H., *In vivo imaging of spontaneous ultraweak photon emission from a rat’s brain correlated with cerebral energy metabolism and oxidative stress*, „Neuroscience Research” 1999, vol. 34, s. 103–113.
- Kobayashi M., Usa M., Inaba H., *Highly sensitive detection and spectral analysis of ultraweak photon emission from living samples of human origin for the measurement of biomedical information*. „Transactions of the Society of Instrument and Control Engineers” 2001, vol. E-1, s. 214–220.
- Koldunov V.V., Kononov D.S., Voeikov V.L., *Oscillations of Photon Emission Accompanying the Oxidative Process in Aqueous Solutions of Glycin with Ribose or Glucose and Effects of Transition Metals and Ascorbic Acid*, „Rivista di biologia” 2000, vol. 93, s. 143–145.
- Komatsu S., Kamal A.H.M., Makino T., Hossain Z., *Ultraweak photon emission and proteomics analyses in soybean under abiotic stress*, „Biochimica et Biophysica Acta – Proteins and Proteomics” 2014, vol. 1844, s. 1208–1218.
- Konev S.V., *Fluorescence and phosphorescence of proteins and nucleic acids*, New York, Plenum, 1967.
- Konev S.V., Lyskova T.I., Nisenbaum G.D., *Very weak bioluminescence of cells in the ultraviolet region of the spectrum and its biological role*. „Biophysics” (USSR) 1966, vol. 11, s. 410–413.
- Konev V.V., Mamedov T.G., Popov G.A., *Spectral composition of cell photochemiluminescence*, „Biofizika” 1974, vol. 19, s. 184–186 (w j. ros.).
- Kummer U., Valeur K.R., Baier G., Wegmann K., Olsen L.F., *Oscillations in the Peroxidase-Oxidase Reaction: A Comparison of Different Peroxidases*, „Biochimica et Biophysica Acta” 1996, vol. 1289, s. 397–403.
- Kurganova R.N., Goncharova T.A., Sinitsyna Y.V., *Lipid peroxidation and antioxidant system of protection against heat shot in pea (Pisum sativum L.) chloroplasts*, „Russian Journal of Plant Physiology” 1997, vol. 44, s. 630–635.

- Kuroda K., *Behavior of Naked Cytoplasmic Drops Isolated from Plant*, [W:] Primitive motile systems in cell biology, pod red. R.D. Allen, N. Kamiya., London, Academic Press, 1964, s. 31–41.
- Laager F.M., Becker N.M., Park S.H., Soh K.S., *Effects of Lac operon activation, deletion of the Yhha gene, and the removal of oxygen on the ultra-weak photon emission of Escherichia coli*, „Electromagnetic Biology and Medicine” 2009, vol. 28, s. 240–249.
- Lavorel J., *A study of dark luminescence in Chlorella. Background luminescence, 3-(3,4-dichloro-phenyl)-1, 1-dimethylurea-triggered luminescence and hydrogen peroxide chemiluminescence*, „Biochimica et Biophysica Acta” 1980, vol. 590, s. 385–399.
- Lavorel J., *Luminescence*, [W:] Bioenergetics of Photosynthesis, pod red. R. Govindjee, New York, Academic Press, 1975, s. 225–314.
- Lehninger A.L. *Biochemistry*, New York, Worth Publishers Inc., 1970.
- Leyko W., Ertel D., Bartosz G., *Effect of hyperthermia and lipid peroxidation on the erythrocyte membrane structure*, „International Journal of Radiation Biology” 1991, vol. 59(5), s. 1185–1193.
- Li K.H., *Bioluminescence and stimulated coherent radiation*. „Laser Elektro-Optik” 1981, vol. 3, s. 32–35.
- Li K.H., Popp F.A., *Non-exponential decay law of radiation systems with coherent rescattering*, „Physics Letters” 1983, vol. 93A, s. 262–266.
- Li W., Haneman D., *Rupture luminescence from natural fibers*, „Journal of Chemical Physics” 1999, vol. 111, s. 10314–10320, doi: 10.1063/1.480379
- Liang Y., Pang R., Feng W., Yuankun H., *Study on water-induced ultra-weak luminescence value of wheat kernels*, „TELKOMNIKA Indonesian Journal of Electrical Engineering” 2013, vol. 11, s. 4935–4941.
- Ma J., Zhu Z., Zhu Y., *Research on detecting technology of biophotons*, „Proceedings of SPIE” 2002, vol. 4634, s. 135–141.
- Maccarrone M., Rosato N., Agro A.F., *Electroporation enhances cell membrane peroxidation and luminescence*, „Biochemical and Biophysical Research Communications” 1995, vol. 206, 238–245.
- Makiuchi M., Miyazaki J., Shiraishi T., Kakinuma K., Inaba H., *Dual charge integrating amplifier circuit using two GaInAs-InP pin photodiodes for ultraweak light detection in the near infrared region*. „IEEE Photonics Technology Letters” 1997, vol. 9, s. 1514–1516.
- Mandoli D.F., Briggs W.R., *Optical properties of etiolated plant tissues*, „Proceedings of the National Academy of Sciences” 1982, vol. 79, s. 2902–2906.
- Marcinko Ch.L.J., Painter S.C., Martin A.P., Allen J.T., *A review of the measurement and modelling of dinoflagellate bioluminescence*, „Progress in Oceanography”, 2013 vol. 109, s. 117–129.

- Marucs R.A., Sutin N., *Electron transfers in chemistry and biology*. „Biochimica et Biophysica Acta” 1985, vol. 811(3), s. 265–322.
- Mathew B.G., Kumar S., *The Non-exponential decay pattern of the weak luminescence from seedlings of Cicer arietinum L. Stimulated pulsating electric fields*, „Experientia” 1992, vol. 48, s. 309–310.
- Mazin B.A., Meeker S.R., Strader M.J., Szypryt P., Marsden D., van Eyken J.C., Duggan G.E., Walter A.B., Ulbricht G., Jonson M., Bumble, B., O'Brien K., Stoughton C., *ARCONS: a 2024 pixel optical through near-IR cryogenic imaging spectrophotometer*, „Publications of the Astronomical Society of the Pacific” 2013, vol. 125(933), s. 1348–1361.
- Miao W., *Electrogenerated chemiluminescence and its biorelated applications*, „Chemical Review” 2008, vol. 108, s. 2506–2553.
- Milczarek I., Jaśkowska A., Gołębiowska D., *Effect of humic acid and polyphenols on ultraweak luminescence from Characeae cells*, [W:] *Humic substances in the global environment and implications for human health*, pod red. N. Senesi, T.M. Miano, Amsterdam, Elsevier Science, 1994, s.323–328.
- Milczarek I., Jaśkowska A., Gołębiowska D., *Influence of humic acids (HA), DCMU and light on ultraweak luminescence of Characeae cells*, „Electronic Journal of Polish Agricultural Universities” 2003, vol. 6, s. 1–10.
- Miyamoto S., Martinez G.R., Medeiros M.H.G., Di Mascio P., *Singlet molecular oxygen generated by biological hydroperoxides*, „Journal of Photochemistry and Photobiology B Biol” 2014, vol. 139, s. 24–33.
- Miyazawa T., Kaneda T., Takyu C., Inaba H., *Characteristics of tissue ultraweak chemiluminescence in rats fed with autoxidized linseed oil*, „Journal of Nutritional Science and Vitaminology” 1983, vol. 29, s. 53–64.
- Miyazawa T., Kaneda T., Takyu C., Yamagishi A., Inaba H., *Generation of singlet molecular oxygen in rat liver homogenate on adding autoxidized linseed oil*, „Agricultural and Biological Chemistry” 1981, vol. 45, s. 1597–1601.
- Moraes T.A., Barlow P.W., Klingelé E., Gallep C.M., *Spontaneous ultra-weak light emissions from wheat seedlings are rhythmic and synchronized with the time profile of the local gravimetric tide*, „Naturwissenschaften” 2012, vol. 99, s. 465–472.
- Morker K.H., Roberts M.R., *Light as both an input and an output of wound-induced reactive oxygen formation in Arabidopsis leaves*, „Plant signaling & behavior” 2011, Vol. 6(8), s. 1087–1089.
- Munné-Bosh S., Alegre L., *The function of tocopherols and tocotrienols in plants*, „Critical Reviews in Plant Sciences” 2002, vol. 21, s. 31–57.
- Nerudová M., Červinková K., Hašek J., Cifra M., *Optical spectral analysis of ultra-weak photon emission from tissue culture and yeast cells*, „Proceedings of SPIE” 2015, vol. 9450, s. 94500O-1–94500O-7, doi: 10.1117/12.2069897.

- Nichols S.J., Schloesser D.W., Geis J.W., *Seasonal growth of the exotic submersed macrophyte Nitellopsis obtusa in the Detroit River of the Great Lakes*, „Canadian Journal of Botany” 1986, vol. 66, s. 116–118.
- Nishimura Y, Tsuboi M., *Raman spectra of flavins avoidance of interference from fluorescence*, „Chemical Physics Letters” 1978, vol. 59, s. 210–13.
- Nissen T., *Ultra-weak Photon (Biophoton) Emissions (UPE)* 2006, <http://www.anatomyfacts.com/Muscle/phototr.html>.
- Nosaka S., Ohkawa T., Okihara K., Yoshikawa K., *Effects of local anesthetics on the Chara plasmalemma*, „Biochimica et Biophysica Acta” 1992, vol. 1106, s. 325–334.
- Nosaka S., Sugano H., Morikochi Y., Amakata Y., Morikawa S., Inubushi T., Ohkawa T., *Uptake of lidocaine by Characean cells*, „Anesthesia and Resuscitation” 1995, vol. 31, s. 93–95.
- Ogata K., Kishimoto U., *Rhythmic change of membrane potential and cyclosis of Nitella internode*, „Plant and Cell Physiology” 1976, vol. 17, s. 201–207.
- Ogata K., *The double-water-film electrode: A device for measuring the resistance and the capacitance of the internode/node interface of Chara as functions of time and temperature*, „Journal of Plant Growth Regulation” 2000, vol. 19, s. 98–105.
- Palozza P., Moualla S., Krinsky N.I., *Effects of beta-carotene and alpha-tocopherol on radical-initiated peroxidation of microsomes*, „Free Radical Biology and Medicine” 1992, vol. 12, s. 127–136.
- Paszewski A., Śpiewła E., *Temperature dependence of the membrane resistance in Characeae cells*, „Physiologia Plantarum” 1986, vol. 66, s. 134–138.
- Pawelczyk E., Zając M., *Chemiczne mechanizmy działania leków*, Poznań, Wydawnictwo Akademii Medycznej, 1995.
- Pełechaty M., Pukacz A., *Klucz do oznaczania gatunków ramienic (Characeae) w rzekach i jeziorach*. Biblioteka Monitoringu Środowiska. Warszawa 2008, s. 1–80.
- Peremyslov V.V., Cole R.A., Fowler J.E., Dolja V.V., *Myosin-Powered Membrane Compartment Drives Cytoplasmic Streaming, Cell Expansion and Plant Development*. „PloS one” 2015, 10(10), e0139331.
- Popp F.A., *Biologie des Lichts*, Berlin - Hamburg, Verlag Paul Parey P, 1984.
- Popp F.A., Li K.H., Nagl W., *A thermodynamic approach to the temperature response of biological systems as demonstrated by low level luminescence of cucumber seedlings*, „Zeitschrift für Pflanzenphysiologie” 1984a, vol. 114, s. 1–13.
- Popp F.A., Nagl W., Li K.H., Scholz W., Weingartner O., Wolf R., *Biophoton emission. New evidence for coherence and DNA as source*, „Cell Biophysics” 1984b. vol. 6, s. 33–52.



- Prasad A., Pospíšil P., *Linoleic acid-induced ultra-weak photon emission from chlamydomonas reinhardtii as a tool for monitoring of lipid peroxidation in the cell membranes*, „PLoS ONE” 2011, vol. 6(7), e22345.
- Prasad P.N., Swiatkiewicz J., Liebow C., Lal M., Pudavur H., Al-Nouri M., Wang X., Krebs L., Friend C.S., Biswas A., Zcubza D., Shen, Y., Joshi M., Bhawalkar J.D., Winiarz J., *New frontiers of photonics: nanophotonics and biophotonics*, „Molecular Crystals and Liquid Crystals” 1999, vol. 2, s. 289–294.
- Precht H., Christophersen J., Hensel H., Larcher W., *Temperature and life*, Berlin, Springer-Verlag, 1973.
- Quickenden T.I., Que Hee S.S. *On the existence of mitogenetic radiation*, „Speculations in Science and Technology” 1981, vol. 4, s. 453–464.
- Quickenden T.I., Que Hee S.S., *Weak luminescence from the yeast Saccharomyces cerevisiae and the existence of mitogenetic radiation*. „Biochemical and Biophysical Research Communications” 1974, vol. 60, s. 764–770.
- Quickenden T.I., Que Hee, S.S., *The spectral distribution of the luminescence emitted during growth of the yeast Saccharomyces cerevisiae and its relationship to mitogenetic radiation*, „Photochemistry and Photobiology” 1976, vol. 23, s. 201–204.
- Radotić K., Radenović C., Jeremić M., *Spontaneous ultraweak bioluminescence in plants: origin, mechanisms and properties*, „General Physiology and Biophysics” 1998, vol. 17, s. 289–308.
- Radotić K., Redenović C., Jeremić M., Vucinić Z., *Effect of propagators and inhibitors on the ultraweak luminescence from maize roots*, „Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence” 1990, vol. 5, s. 221–225.
- Raffi-Tabar, H., Rafieiolhosseini N., *Different aspects of ultra-weak photon emissions*. „Iranian Journal of Medical Physics” 2015, vol. 12, s. 137–144.
- Rao K.V.M., Sriedevi V., Satyanarayana N.V., *Heat shock induced lipid changes and solute leakage in germinating seeds of pigeonpea*, „Biologia Plantarum” 2002, vol. 45, s. 71–76.
- Rappaport F., Lavergne J., *Thermoluminescence: theory*, „Photosynthesis. Research” 2009, vol. 101, s. 205–216.
- Rastogi A., Pospíšil P., *Spontaneous ultraweak photon emission imaging of oxidative metabolic processes in human skin: effect of molecular oxygen and antioxidant defence system*. „Journal of Biomedical Optics” 2011, vol. 16 (9), 096005, doi: 10.1117/1.3616135
- Reiserer A., Ritter S., Rempe G., *Nondestructive Detection of an Optical Photon*, „Science” 2013, vol. 342, s. 1349–1351.
- Rodionow C., Frank G.M., *Ob Izmerenii mitogeneticzeskich luzcej szcztetnikom fotoelektronow*, Leningrad, Issl. Po Mit. Izl., 1934.

- Roschger P., Scott R.Q., Devaraj B., Inaba H., *Observation of phase transitions in intact leaves by intrinsic low-level chemiluminescence*, „Photochemistry and Photobiology” 1993, vol. 57, s. 580–583.
- Rylska T., *Promieniowanie tzw. mitogenetyczne pączkujących drożdży i narośli rakowej ziemniaka*, „Annales UMCS Sectio C” 1948, vol. 3, s. 355–417.
- Salari V., Valian H., Bassereh H., Bókkon I., Barkhordari A., *Ultraweak photon emission in the brain*, „Journal of Integrative Neuroscience” 2015, vol. 14, s. 419–429.
- Salin M.L., *Peroxidases and plant chemiluminescence*, [W:] Biological Luminescence, pod red. B. Jezowska-Trzebiatowska, B. Kochel, J. Slawinski, W. Strek, Singapore, World Scientific Publishing, 1990, s. 237–359.
- Schauf B., Rapas L.M., Kaufmann R., *Localization of ultraweak photon emission in plants*, „Photochemistry and Photobiology” 1992, vol. 55, s. 287–291.
- SCHOTT, Optical Filters (Glass Filters), SCHOTT total customer care, 1998
- Schuster G.B., Horn K.A., *Chemically initiated electron-exchange luminescence*, [W:] Chemical and biological generation of excited states, pod red. W. Adam, G. Cilento, New York, Academic Press, 1982, s. 229–247.
- Scott R.Q., Roschger P., Devaraj B., Inaba H., *Monitoring a mammalian nuclear-membrane phase-transition by intrinsic ultraweak light emission*, „FEBS Letters” 1991, vol. 285, s. 97–98.
- Scott R.Q., Usa M., Inaba H., *Ultraweak emission imagery of mitosing soybeans*, „Applied Physics B” 1989, vol. 48, s. 183–185.
- Shepherd V.A., Goodwin P.B., *Seasonal patterns of cell-to cell communication in Chara corallina Klein ex Willd. I. Cell-to-cell communication in vegetative lateral branches during winter and spring*, „Plant Cell and Environment” 1992, vol. 15, s. 137–150.
- Shimizu Y., Inaba H., Kumaki K., Mizuno K., Hata S., Tomioka S., *Measuring methods for ultra-low light intensity and their application to extra-weak spontaneous bioluminescence from living tissues*, „IEEE Transactions on Instrumentation and Measurement” 1973, vol. 22, s. 153–157.
- Shimmen T., Yokota E., *Cytoplasmic streaming in plants*. „Current Opinion in Cell Biology” 2004, vol. 16, s. 68–72.
- Sibaoka T., *Action potentials in plant organs*, „Symposia of the Society for Experimental Biology”, 1966, vol. 20, s. 49–74.
- Siebert W., Seffert H., *Zur Frage des physikalischen Nachweisses der Gurwitsch-Strahlung*, „Archives of Science in Biology” (Russ.) 1934, vol. 35, s. 177–9J.
- Silva E., Rodriguez G., Falioni A., Cilento G., *Excitation of mesophyll and bundle sheath chloroplasts of Atriplex repanda in the absence of light*, „Photochemistry and Photobiology” 1991, vol. 53, 271–274.

- Skierczyńska J., Śpiewła E., Żołnierczuk R., Siewiewsiuk J., Wardak A., Zarebski W., *Zależność oporu elektrycznego błony komórkowej i soku wakuolarnego komórek Characeae od okresu wegetacji*, „Annales UMCS sectio C” 1975, vol. 30, s. 68–73.
- Sławińska D., *Chemiluminescence and the formation of singlet oxygen in the oxidation of certain polyphenols and quinines*, „Photochemistry and Photobiology” 1978, vol. 28, s. 453–458.
- Sławińska D., Polewski K., Sławiński J., *The stress-induced electromagnetic emission from biosystems: chemiluminescence response of plants to mechanical and chemical damage*. „Bioelectrochemistry and Bioenergetics” 1992, vol. 343, s. 483–488.
- Sławińska D., *Spectral analysis of ultraweak photon emission from plants*, [W:] Biological Luminescence, pod red. B. Jezowska-Trzebiatowska, B. Kochel, J. Sławinski, W. Strek, Singapore, World Scientific Publishing, 1990, s. 197–213.
- Sławiński J., Grabikowski E., Cieśla L., *Spectral distribution of ultraweak luminescence from germinating plants*, „Journal of Luminescence” 1981, vol. 24/25, s. 791–794.
- Sławiński J., Grabikowski E., Majchrowicz I., *Ultraweak photon emission generated by germination*, [W:] Ultraschwache Photoemission aus biologischen Systemen, pod red. H. Breithaupt, H. Fischer, H. Klima, F.A. Popp, B. Ruth, J. Sławiński, S.S. Song, U. Warnke, Biomed. Verlag GmbH, Wachtberg, Biophoton Physics 1980, vol. 4, s. 73–100.
- Sławiński J., Grabikowski E., Milczarek I., *A study of seeds vitality by means of quantummeter apparatus for ultraweak luminescence. II. Influence of temperature on biochemiluminescence intensity of germinating seeds*, „Zeszyty Naukowe AR w Szczecinie” 1974, vol. 42, s. 307–322.
- Sławiński J., *Metody badania słabych emisji fotonowych z układów biologicznych*, [W:] Biospektroskopia, Tom 3, pod red. J. Twardowskiego, Warszawa, PWN, 1989, s.107–213.
- Sławiński J., Popp F.A., *Temperature hysteresis of low-level luminescence from plants and its thermodynamical analysis*. „Journal of Plant Physiology” 1987, vol. 130, s. 111–123.
- Smirnoff N., Wheeler G.L., *Ascorbic acid in plants: Biosynthesis and function*, „Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology” 2000, vol. 35, s. 291–314.
- Śpiewła E., *Depedence of amplitude oscillatory changes in potential and electrical resistance of Nitellopsis obtusa cell membranes on the stage of cell development*, „Acta Societatis Botanicorum Poloniae” 1994, vol. 63, s. 187–189.
- Śpiewła E., *Depedence of oscillatory changes in electrical resistance of Nitellopsis obtusa cell membranes on the vegetation season*, „Acta Societatis Botanicorum Poloniae” 1995, vol. 64, s. 375–377.

- Śpiewla E., *Niejednorodność elektrycznych właściwości komórek roślinnych Characeae*, „Folia Societatis Scientiarum Lublinensis” 1979, vol. 21, s. 87–92.
- Śpiewla E., Tokarska M., *Oscillations of membrane potential during inhibition of cytoplasmic streaming in Characean internodes*, „Physiologia Plantarum” 1990, vol. 80 s. 191–195.
- Steinberg S.M., Poziomek E.J., Engelmann W.H., Rogers K.R., *A review of environmental applications of bioluminescence measurements*, „Chemosphere” 1995, vol. 30, s. 2155–2197.
- Strogatz S.H., Stewart I., *Coupled oscillators and biological synchronization*, „Scientific American” 1993, vol. 269, s. 68–75.
- Sugioka K., Nakano M., *A possible mechanism of generation of singlet molecular oxygen in NADPH-dependent microsomal lipid peroxidation*, „Biochimica et Biophysica Acta” 1976, vol. 423, s. 203–216.
- Sul'tsman F.M., Petrusевич Iu.M., Tarusov B.N., *Circadian rhythms of ultraweak chemiluminescence of bean roots*, „Biofizika” 1976, vol. 21, s. 688–691 (w j. ros.).
- Sun Y., Wang C., Dai J., *Biophotons as a neural communication signals demonstrated by in situ biophoton autography*, „Photochemical and Photobiological Sciences” 2010, vol. 9, s. 315–322.
- Suzuki N., Inaba H., *Biophoton phenomena and active oxygen species*, „Photomedicine and Photobiology” 1989, vol 11, s. 15–26.
- Swain J., *Single photon detectors for biology: Present and future*, „Indian Journal of. Experimental Biology” 2003, vol. 41, s. 528–538.
- Sweeney B.M., *Rhythmic phenomena in plants*, San Diego, Academic Press, 1987.
- Takeda M., Kobayashi M., Takayama M., Suzuki S., Ishida T., Ohnuki K., et al. *Biophoton detection as a novel technique for cancer imaging*. „Cancer Science” 2004, vol. 95, s. 656–61.
- Tang Y., Tan S., Li D., Xing D., *Ultraweak bioluminescence from leaves induced by illumination and its spectral analysis*, „Proceedings of SPIE” 1999, vol. 3863, s. 341–345.
- Tarusov B.N., Ivanov I.I., Petrusевич Yu.M., *Ultraweak luminescence in biological systems*. Moscow, Moscow University Press, 1967 (w j. ros.).
- Tarusow B.N., Wiesołowski W.A., *Swierchslabyje swiecenia rastienij i ich prikladnoje znaczenije*, Moskwa, Izd. MGU, 1978.
- Tazawa M., *Sixty years research with characean cells: fascinating material for plant cell biology*, in: U. Lüttge, W. Beyschlag, B. Büdel, D. Francis (Eds.), „Progress in Botany” 2011, vol. 72, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, s. 5–34.
- THORN EMI „Photomultipliers and accessories”, THORN EMI Electron Tubes Ltd. ,1993.

- Tilbury R.N., Miller H., *Chemiluminescence from the oxidation of model lipid systems*, 1999, <http://www.photobiology.com/photobiology99/contrib/tilbury/> [dostęp 10 grudnia 2015].
- Tilbury R.N., Quickenden T.I., *Spectral and time dependence studies of the ultraweak bioluminescence emitted by the bacterium Escherichia coli*, „Photochemistry and Photobiology” 1988, vol. 47, s. 145–150.
- Tokarska M., Śpiewła E., *Oscylacyjne zmiany przewodnictwa membranowego i plazmodesmatycznego złącz komórek Nitellopsis obtusa*, „Prace Naukowe PL - Fizyka” 1993, vol. 230(9), s.103–108.
- Toko K., Hayashi K., Yoshida T., Fujiyoshi T., Yamafuji K., *Oscillations of electric spatial patterns emerging from the homogeneous state in Characean cells*, „European Biophysics Journal” 1988, vol. 16, s. 11–21.
- Torinuki W., Kumai N., Miura T., Seiji M., *Effect of beta-carotene on ultraweak chemiluminescence of UVB-irradiated squalene*, „Tohoku Journal of Experimental Medicine” 1982, vol. 136, s. 459–460.
- Truscott T.G.,  *$\beta$ -Carotene and disease: a suggested pro-oxidant and anti-oxidant mechanism and speculations concerning its role in cigarette smoking*, „Photochemistry and Photobiology B” 1996, vol. 35, s. 233–235.
- Trushin M.V., *Distant non-chemical communication in various biological system*, „Rivista di Biologia” 2004, vol. 97, s. 399–432.
- Tryka S., *Cut-off Filter Method for Light-induced Photon Emission Spectra Estimation*, „Computers and Chemistry” 1998, vol. 22, s. 113–118.
- Tryka S., *Ocena czasu nawilżania okryw owocowo-nasiennych ziarna pszenicy metodą pomiarów ultrasłabej luminescencji*, „Acta Agrophysica” 2006, vol. 8, s. 515–525.
- Tudisco S., Musumeci F., Scordino A., Privitera G., *Advanced research equipment for fast Ultraweak luminescence analysis*, „Review of Scientific Instruments” 2003, vol. 74, s. 4485–4491.
- Uchida G., Nemoto T., Tsuchiya Y., *Characteristics in sliding motions of small organelles in a Nitella internodal cell*, „Journal of the Physical Society of Japan” 1995, vol. 64, s. 4959–4963.
- Urbaniak J., Sugier P., Gąbka M., *Charophytes of the lubelszczyzna region (Eastern Poland)*, „Acta Societatis Botanicorum Poloniae” 2011, vol. 80(2), s. 159–168.
- Usa M., Kobayashi M., Scott R.O., Maeda T., Hiratsuka R., Inaba H., *Simultaneous measurement of biophoton emission and biosurface electric potential from germinating soybean (Glycine max)*, „Protoplasma” 1989, vol. 149, s. 64–66.
- Usa M., Kobayashi M., Scott R.Q., Hiratsuka R., Maeda T., Inaba H., *Ultraweak biophoton emission and bioelectrical activity in plant tissues*. [W:] Biological Luminescence, pod red. B. Jezowska-Trzebiatowska, B. Kochel, J. Slawinski, W. Strek, Singapore, World Scientific Publishing, 1990, s.117–130.

- Van Wijk E.P., Van Wijk R.V., *Multi-site recording and spectral analysis of spontaneous photon emission from human body*, „Forschende Komplementärmedizin und klassische Naturheilkunde” 2005, vol. 12, s. 96–106.
- Van Wijk E.P.A., Van der Greef J., Van Wijk R., *Photon counts statistics in leukocyte cell dynamics*, „Journal of Physics Conference Series” 2011, vol. 329, 012021.
- Van Wijk R., Van Wijk E.P.A., *Oscillations in ultraweak photon emission of *Acetabularia acetabulum* (L.)*, „Indian Journal of Experimental Biology” 2003, vol. 41, s. 411–418.
- Vass I., Horvath G., Herczeg T., Demeter S., *Photosynthetic energy conservation investigated by thermoluminescence. Activation energies and half-lives of thermoluminescence bands of chloroplasts determined by mathematical resolution of glow curves*, „Biochimica et Biophysica Acta” 1981, vol. 634, s. 140–152.
- Vassilev R.F., *Bioluminescence*, [W:] Trans. Moscow Soc. Natur., pod red. A.I. Zhuravlov, Science Publ. House, Moscow, 1965. vol. 21, s. 170–176.
- Vassilev R.F., *Chemiluminescence in liquid-phase reactions*, „Progress in reaction kinetics” 1967, vol. 4, s. 305–352.
- Vladimirov Y.A., Proskurnina E.V., *Free radicals and cell chemiluminescence*. „Biochemistry” 2009, vol. 74, s. 1545–1566.
- Vladimirov Y.A., *Ultraweak luminescence accompanying biochemical reactions*. Springfield, Vermont, NASA, 1966.
- Voeikov V., *Reactive oxygen species, water, photons, and life*, „Rivista di biologia” 2001, vol. 94, s. 237–258.
- Voeikov V.L., Koldunov V.V., Kononov D.S., *Sustained oscillations of chemiluminescence in course of amino-carbonyl reaction in aqueous solutions*, „Russian Journal of Physical Chemistry A” 2001, vol. 75, s. 1579–1585.
- Volodyaev I., Belousov L.V., *Revisiting the mitogenetic effect of ultra-weak photon emission*, „Frontiers in Physiology”, 2015, vol 6: 241 s. 1–20.
- Watanabe H., Kobayashi M., Suzuki S., Usa M., Agatsuma S., Saeki R., Inaba H., *Aldehyde-enhanced photon emission from crude extracts of soybean seedlings*, „Biochimica et Biophysica Acta”, 1991, vol. 1058, s. 209–216.
- Weidemann G., Muller-Kleiser W., Walenta S., Schleinkofer L., Wood W.G., *Low light level in vitro monitoring of cellular and antigen-antibody reactions using a photon detection camera system – new perspectives for clinical diagnosis and research*, „Klinische Wochenschrift” 1990, vol. 68, s. 33–37.
- Winter U., Kirst G.O., Meyer M.I.B., *Seasonal changes of ionic concentrations in the vacuolar sap of *Chara vulgaris* L. growing in a brackish water lake*, „Oecologia” 1987, vol. 74, s. 122–127.
- Yang M., Pang J., Liu J., Liu y., Fan H., Han J., *Spectral discrimination between healthy people and cold patients using spontaneous photon emission*, „Biomedical Optics Express” 2015, vol. 6, s. 1331–1339 .

- Yoshikawa K., Fujimoto T., Shimooka T., Terada H., Kumazawa N., Ishii T., *Electrical oscillation and fluctuation in phospholipid membranes. Phospholipid can form a channel without protein*, „Biophysical Chemistry” 1988, vol. 29, s. 293–299.
- Zeng L., Xing D., Zhang L., Li Q., Wang Ch., *Spectroscopic studies on origination of the peak at 730 nm in delayed fluorescence of chloroplasts*, „Luminescence” 2007, vol. 22, s. 387–392.
- Zhang J., Yu W., Sun T., Popp F.A., *Spontaneous and light-induced photon emission from intact brains of chick embryos*, „Science in China Series C: Life Sciences” 1997, vol. 40, s. 43–51.
- Zhang J.G., Zhong L.F., Zhang M., Xia Y.X., *Protection effects of procaine on oxidative stress and toxicities of renal cortical slices from rats caused by cisplatin in vitro*, „Archives of Toxicology” 1992, vol. 66, s. 354–358.
- Zherebin Yu.L., Sava V.M., *Photomultiplier selection for ultraweak chemiluminescence*, „Instrum. Exp. Tech” 1980, vol. 23, s. 1457–1459.
- Zhuravlev A.I., Aleksander I., Trostkinov V.N., *Luminescence in living cells*, Moscow, Nauka, 1968.
- Żołnierczuk R., *The measurement of Nitellopsis obtusa cell impedance by external electrodes*, „Folia Societatis Scientiarum Lublinensis C” 1971, vol. 11, s. 53–71, (In Polish, English summary).
- Zurzycki J., *Struktura i własności mechaniczne warstwy kontaktowej chloroplast-cytoplazma*, „Prace z Biologii Molekularnej” 1979, vol. 6, s. 121–131.

# **ANEKSY**



## ANEKS I

### Wykaz stosowanych filtrów granicznych

**Tabela 10.1.** Wykaz oznaczeń stosowanych filtrów granicznych przepuszczających długofalową część widma światła (long pass filters) firmy SCHOTT i odpowiadające im granice przepuszczalności. Tabelę sporządzono na podstawie katalogu producenta (SCHOTT 1998).

Oznaczenie filtru	Granica krótkofalowa [nm]
WG 335	330
WG 360	356
GG 385	371
GG 400	391
GG 420	412
GG 435	429
GG 455	448
GG 475	468
GG 495	486
OG 515	507
OG 530	521
OG 550	542
OG 570	562
OG 590	582
RG 610	601
RG 630	622
RG 665	651
RG 695	684
RG 715	704

## ANEKS II

### **Skład pożywek oraz sposób hodowli bakterii i Zielenic bytujących na ściankach glonów *Nitellopsis obtusa***

#### **Skład pożywek:**

##### **1). Pożywka 79 CA:**

mannitol – 10,0 g  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 0,5 g  
MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O – 0,2 g  
NaCl – 0,1 g  
CaCO<sub>3</sub> – ślad  
wyciąg drożdżowy YE – 1,0 g  
hydrolizat kazeiny – 0,1%  
woda destylowana 1000 ml – pH 6.8–7

##### **2). Pożywka LB:**

bacto trypton BT – 10,0 g  
NaCl – 10,0 g  
wyciąg drożdżowy YE – 5,0 g  
woda destylowana 1000 ml, pH 7.

**W celu uzyskania kultur bakterii** zaadsorbowanych na powierzchni komórki, glony płukano 3 razy w jałowej wodzie. Następnie odpowiednimi szczypcami umieszczano komórkę w płynnej pożywce 79 CA. Bakterie namnażano w ciągu nocy w temp. 28°C. Uzyskane kultury osadzano poprzez wirowanie w ciągu 5 minut (5000 obr/min).

**W celu uzyskania kultur glonów**, np. typu Zielenic zaadsorbowanych na powierzchni badanych komórek *Nitellopsis obtusa*; komórkę przemytą wodą umieszczano na płytce Petriego w pożywce LB z 1,5% agarem i dodatkiem antybiotyków Penicyliny G i Streptomycyny o stężeniu 20 µg cm<sup>-3</sup> – w celu uśmiercenia bakterii. Płytkę umieszczano pod źródłem światła (ok. 5000 lux) w temp. pokojowej. Po około 7 dobach inkubacji pojawiał się zielono-brunatny nalot. Taki wynik inkubacji otrzymano dla komórek pobranych z jeziora wiosną, natomiast dla komórek „jesiennych” wynik inkubacji był ujemny.

## ANEKS III

### Przygotowanie preparatów do badań metodą mikroskopii elektronowej

Frację lipidową oraz frakcję mikrosomalną wzbogaconą w rybosomy, przygotowywano do badań elektronowym mikroskopem transmisyjnym TESLA BS-500 wg następującej procedury.

1. Utrwalanie próbek przeprowadzano w świeżo przygotowanym utrwalaczu, o składzie:

- 2% paraformaldehydu,
  - 2,5% glutaraldehydu,
- w 0,1 M buforze kakodylanowym o pH 7,4.

Przygotowane skrawki utrwalano w tym utrwalaczu w temperaturze pokojowej w ciągu 2 h, po czym utrwalanie kontynuowano przez noc w temp. 4°C. Skrawki płukano przez 24 h w 0,1 M buforze kakodylanowym (3–5 zmian), w 4°C.

2. Kontrastowanie preparatów realizowano w sposób rutynowy.

Po wypłukaniu skrawków (j.w.) preparaty były dokontrastowywane w 1% OsO<sub>4</sub> w 0,1 M buforze kakodylanowym o pH 7,4 przez 2 h w temp. 4°C. Następnie przepłukiwano je 2 razy po 5 min w tym samym buforze kakodylanowym i płukano dwukrotnie, po 5 min, w wodzie destylowanej.

3. Dobarwianie preparatów dokonywano w ten sposób, że po przepłukaniu były one ponownie dokontrastowywane w 0,5% wodnym roztworze octanu uranylu w ciągu 2 h, w temperaturze pokojowej.

4. Odwadnianie preparatów prowadzono poprzez kąpiele w seriach alkoholowych: 30%, 50%, 70%, po 15min, w temp. 4°C, zaś w stężeniach: 90%, 95%, 100% po 15 min, w temperaturze pokojowej. Po kąpielach alkohol etylowy zastępowano tlenkiem propylenu (alkohol etylowy nie rozpuszcza żywic). Następnie preparaty umieszczano kolejno w roztworach o wzrastających stężeniach tlenku propylenu w alkoholu:

- 2 części alkoholu + 1 część tlenku propylenu – 10 min,
- 1 część alkoholu + 1 część tlenku propylenu – 10 min,
- 1 część alkoholu + 2 części tlenku propylenu – 10 min,
- czysty tlenek propylenu – 2 razy 10 min.

5. Nasywanie żywicami prowadzono po zastąpieniu alkoholu tlenkiem propylenu, z kolei tlenek propylenu był stopniowo zastępowany żywicą w kolejnych roztworach o wzrastających stężeniach. Preparaty utwardzono w żywicy Spurr Low3 Viscosity w następujący sposób:

2 części tlenku propylenu + 1 część żywicy	– 1 h,
1 część tlenku propylenu + 1 część żywicy	– 1 h,
1 część tlenku propylenu + 2 części żywicy	– 1 h,
czysta żywica	– 1 h.

Po tym zabiegu preparaty umieszczano w polietylenowych kapsułkach, zalewano żywicą i pozostawiano przez 12 h w temperaturze 70°C w celu spolimeryzowania.

6. Krojenie preparatów.

Po spolimeryzowaniu preparaty krojono na skrawki półcienkie o grubości 0,5–0,7µm oraz ultracienkie o grubości 60 nm, przy pomocy ultramikrotomu *Reichert Ultracut S*.

7. Barwienie preparatów realizowano następująco:

- a) Preparaty półcienkie barwiono 1% błękitem metylenowym z 1% *Azurem II* w 1% wodnym roztworze czteroboranu sodu. Po zabarwieniu, preparaty były sprawdzane przy pomocy mikroskopu optycznego *Jenaval Contrast*;
- b) Preparaty ultracienkie barwiono 8% roztworem octanu uranylu w 0,5% kwasie octowym przez 45 min, a następnie po przepłukaniu i wysuszeniu, przez 10 min, cytrynianem ołowiu wg. Raynolds'a.

8. Negatywowe barwienie.

Zawiesina była nanoszona na siateczki pokryte błoną z formwarh. Nadmiar zawiesiny odciągany był bibułą filtracyjną, następnie na siateczki był nakrapiany 1% roztwór molibdenianu amonu i powtórnie jego nadmiar był odciągany bibułą filtracyjną.

Siateczki bez suszenia były umieszczone w kolumnie mikroskopu elektronowego transmisyjnego *BS-500 Tesla*.

Opisu przygotowania preparatów dokonano na podstawie dokumentacji mikroskopu transmisyjnego *Tesla BS-500*.

## ANEKS IV

### Otrzymywanie liposomów $\alpha$ -tokoferolu i $\beta$ -karotenu

Do otrzymania liposomów z  $\alpha$ -tokoferolu i  $\beta$ -karotenu użyto:

$\beta$ -karotenu, Merck, (z proszku krystalicznego o czystości 95%),  
witaminy E ( $\alpha$ -tokoferolu) Polfa, (ampułki do iniekcji – 0.3 mg/ml).

Ośrodkiem dyspersyjnym dla liposomów (środowiskiem, w którym liposomy były zawieszane, tworząc „pseudoroztwór”) był bufor Tricine (Sigma), o pH 7,8.

„Roztwory” liposomów otrzymano wg następującej procedury. Wymienione substancje rozpuszczano w chloroformie, uzyskując roztwory o znanym stężeniu i w takich ilościach, aby dysponować pewnym ich nadmiarem, w stosunku do ilości przewidzianej do przygotowania „roztworu” liposomów w buforze. Określone objętości chloroformowych roztworów karotenu oraz witaminy E, przenoszono do czystych zlewek i odparowywano do sucha. Do odparowania brano takie objętości roztworów chloroformowych, aby stężenie liposomów karotenu oraz witaminy E w „roztworach” (zawieszonych w buforze) wynosiło nie mniej niż 0,2 mg na 1 ml buforu.

Suchą substancję przeznaczoną do wytwarzania liposomów, tworzącą w zlewce o pojemności 25 ml warstewkę osadu na dnie i ściankach, zalewano 10 ml buforem Tricine o pH 7,8, zawierającego 0,5% etanolu. Zawartość zlewek poddawano kolejno działaniu ultradźwięków, stosując dezintegrator ultradźwiękowy (typ UD-20, Techpan). Łączny czas działania ultradźwięków wynosił około 1 min, lecz dezintegrator pracował w sekwencji: 5 sekund działania – 5 sekund przerwy. Zlewka z tworzącymi się liposomami była zanurzona w wodzie z lodem w celu chłodzenia roztworu, aby zapobiec przegrzaniu i rozpadaniu się powstających liposomów. W miarę zwiększania czasu działania ultradźwięków na roztwór, obserwowano zmianę jego wyglądu: pojawiało się charakterystyczne zmętnienie i opalizowanie. Kolejna operacja tworzenia „roztworu” liposomów – polegała na poddaniu go wirowaniu przy 15 tys. obrotów na minutę (100 tys.  $\times$  g) w celu oddzielenia – powstałych ewentualnie podczas sonifikacji tworów nie będących liposomami, a osiadających na dnie próbówki wirówkowej. Supernatant z wirowania stosowany był do właściwych badań.

*Liposomy otrzymano dzięki uprzejmości Zakładu Biofizyki Instytutu Fizyki UMCS.*