



УДК 535.5:546

*Двенадцатая Международная научно-техническая конференция
«Оптические методы исследования потоков»
Москва, 25 — 28 июня 2013 г.*

М.В. Гончарова¹, С.С. Сафонов¹, Р.Р. Асланян²

¹*Международный университет природы общества и человека «Дубна», филиал «Угреша»,
Россия, 1400093, Московская область, г. Дзержинский. ул Академика Жукова, 24, E-mail:
mariy-goncharov@yandex.ru*

²*Московский Государственный университет им М.В. Ломоносова, 119991, Россия, Москва,
Ленинские горы, МГУ, д. 1, стр. 12, биологический факультет, E-mail: mariy-
goncharov@yandex.ru*

ВОЗМОЖНОСТИ ПОЛЯРИЗАЦИОННОГО АНАЛИЗА ИНТАКТНЫХ КЛЕТОК

АННОТАЦИЯ

Функциональные изменения свойств сообщества связаны с изменением структуры, и отдельные структурные показатели хотя и отражают особенности этой связи, но сами по себе оказываются недостаточными для ее полного описания. Вместе с тем на особенности этой связи оказывают воздействие изменения физиологического состояния отдельных популяций при эксплуатации общего биотопа в условиях ограниченности резервов питания. Все это приводит к необходимости отыскания такого обобщенного показателя, который, учитывая структурные характеристики сообщества, отражал бы при этом особенности его физиологического состояния, т.е. задача сводится к получению такой функции, с помощью которой по измеренным или рассчитанным структурным показателям сообщества можно определить его физиологическую активность.

Применение обобщенных безразмерных показателей структуры и функции отражает результат воздействия на сообщество всей совокупности факторов окружающей среды (обеспеченности питанием, пространством, светом и т. д.), вследствие чего использование их оказывается более успешным, чем отыскание частных связей между отдельными факторами внешней среды и функциональными показателями системы.

ПОЛЯРИЗАЦИОННЫЙ СВЕТ, СТРУКТУРА СООБЩЕСТВА, ИНТАКТНЫЕ КЛЕТКИ, ОБОБЩЕННЫЙ БЕЗРАЗМЕРНЫЙ ПОКАЗАТЕЛЬ, ЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ, ДИХРОИЗМ, ОПТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ, ДВОЙНОЕ ПРЕЛОМЛЕНИЕ.

ВВЕДЕНИЕ

Коснемся одного из возможных вариантов реализации задачи применения обобщенных безразмерных показателей, отражающих результат воздействия факторов окружающей среды на сообщество. Проблемы исследования структуры материи имеют огромное значение для биологии, ибо структура является основой функционирования любой системы, определяя ее разнообразные свойства. Поэтому необходимо развитие методов исследования таким образом, чтобы они смогли обеспечить получение информации о степени упорядоченности живых структур.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И РЕЗУЛЬТАТЫ

Сформулируем основные требования к методам исследования степени упорядоченности. Для этого обратимся к гипотезе стохастической псевдокристалличности, в соответствии с которой структуры рассматриваются как трехмерные случайные поля, обладающие упорядоченностью, степень которой обуславливает свойства и функциональные возможности исследуемых объектов. Структура является основой функционирования любой системы, определяя ее разнообразные свойства. Материальным носителем жизнедеятельности организма является структурная организация живого объекта. Причем индикатором на изменения состояния живой системы, в том числе и при изменении среды обитания, должны явиться динамические изменения ('динамика изменения градиентов, потоков этих изменений, скоростей и направлений) пространственной и временной организации материального носителя "состояния" организма, учитывающего глубокую общность и взаимосвязь морфологии, физиологии и биохимии клетки.

Это означает, что, если разработаны методы и устройства получения информации о неразрушенном объекте по трем координатам, то возможно иметь количественную информацию о свойствах этого объекта. Для живых систем помимо пространственных координат существует и временная.

Рассмотрим один из вариантов получения подобной информации в экспериментах. Структура является основой функционирования любой системы, определяя ее разнообразные свойства. Материальным носителем жизнедеятельности организма является структурная организация живого объекта. Причем индикатором на изменения состояния живой системы должны явиться динамические изменения (динамика изменения градиентов, потоков этих изменений, скоростей и направлений) пространственной и временной организации материального носителя "состояния" организма, учитывающего глубокую общность и взаимосвязь морфологии, физиологии и биохимии клетки.

Нас должна интересовать возможность получения информации, позволяющей судить не только о наличии или количестве в клетках важнейших биополимеров (белков, нуклеиновых кислот, липидов, полисахаридов), но и об их пространственном распределении, а также структурной организации в клетках, одним из параметров которой является определенная ориентация в макромолекулах определенных химических связей. Можно предположить, что преимущественная ориентация определенных химических связей в ансамблях макромолекулярных компонентов клеток характеризует организованность биосистемы (соответственно и ее функциональное состояние) в определенный момент времени. Именно это узкосмысловое толкование вкладывается в понятие структурных изменений биополимеров клетки, которым будем оперировать ниже.

Для анализа возможной взаимосвязи теории и эксперимента мы обратились к понятиям изотропности или анизотропности системы. Для этого экспериментально необходимо получить данные о наличии, распределении и пространственной упорядоченности биополимеров в клетках.

Поляризованный свет широко используется для изучения анизотропии веществ. Взаимодействие поляризованного света с любой анизотропной средой содержит в своих результатах информацию об этой анизотропии. При работе с биологическими объектами возможности здесь практически неисчерпаемы. Нет сомнения в высокой биологической целесообразности и важности всех этих структур, что определяет и необходимость их изучения. Однако имеется целый ряд особенностей такого анализа при работе с целыми клетками, рассмотрим их.

Главными методами исследования анизотропии вещества, основанными на поляризации света, следует считать, с нашей точки зрения, поляризованную люминесценцию, дихроизм, оптическую активность и двойное преломление.

Степень взаимодействия света с образцом в спектроскопии НПВО зависит от состояния поляризации света. Как правило, в спектральных приборах световой луч уже

частично поляризован, причем степень поляризации зависит от длины волны и может меняться при введении в пучок света образца или иных элементов. В результате состояние поляризации светового потока становится неопределенным. Поскольку аналитические выражения для глубины проникновения излучения в образец для перпендикулярной и параллельной компонент плоскополяризованного света существенно различны, очевидно, что при количественных измерениях целесообразно работать с поляризованным светом.

Поскольку вид спектра МПВО зависит от поляризационной способности спектрального прибора даже при измерении изотропных веществ, для выполнения количественных измерений в условиях внутреннего отражения должны быть известны характер и степень поляризации источника излучения. Из литературы известно, что для случаев слабого поглощения ($K \leq 0.1$) однородной среды, эффективные толщины МО и ТП для параллельной и перпендикулярной компонент плоскополяризованного света описываются достаточно простыми выражениями, которые легко использовать для практических расчетов. Для режима «тонкой пленки» помимо требования к однородности предполагается, что ее внешняя поверхность параллельна поверхности измерительного элемента.

Однако показатель поглощения отдельных полос микроорганизмов достигает значений $0,2 \div 0,3$, кроме того интактные клетки являются чрезвычайно сложными объектами, поэтому без дополнительных исследований использовать аппроксимированные выражения для расчетов не представляется возможным.

Помимо этих соображений существуют и другие, которые следует рассмотреть и проанализировать. Из литературы известно, что обнаружен и исследован эффект самопроизвольной плоскостной ориентации асимметричных макромолекул в поверхностном слое пленки вблизи подложки для полипептида поли-бензил-глутамата, который проявляет себя в поляризованных спектрах поглощения для полос амид 1 и амид 2. Поэтому при проведении количественных измерений необходимо выяснить, проявляет ли себя этот эффект при анализе интактных клеток.

Кроме того, в случае линейной поляризации под углом 45° к плоскости падения свет, испытав полное внутреннее отражение, приобретает разность фаз между компонентами (лежащей в плоскости падения и перпендикулярной к ней). В таком случае измерительный элемент МПВО может выступать как фазосдвигающая пластинка. Поскольку при многократном отражении света от рабочих поверхностей ИЭ можно ожидать, что сдвиг фаз между компонентами будет принимать различные значения (в том числе и 90°), следовательно, в различных точках рабочей поверхности взаимодействие вещества со светом будет осуществляться при различных углах поляризации, т.е. со светом, поляризованным как по кругу, так и с эллиптически поляризованным. Причем в зависимости от азимута линейно поляризованного света, может возникать как правоциркулярный, так и левоциркулярный поляризованный свет. Таким образом, при указанной линейной поляризации источника излучения есть основания полагать, что при взаимодействии света с интактными клетками, нанесенными на измерительный элемент МПВО, могут возникать эффекты, учитывать которые необходимо при количественных измерениях.

Необходимо также отметить, что любые эффекты или особенности, которые возникают или проявляют себя при взаимодействии светового потока с контролируемым объектом, несут информацию как о самом объекте, так и об отношении его со средой обитания. Задача заключается в том, чтобы проявить эту информацию.

Рассмотрим перечисленные особенности при условии, что свет взаимодействует с неразрушенными клетками.

Особенности использования линейно поляризованного света, азимут поляризации которого равен 0° или 90° .

Известно, что интенсивность полос поглощения МПВО при оптимальном выборе условий получения спектров, определяемая экспериментально, связана с количеством исследуемого вещества следующим соотношением:

$$-\ln R = \alpha N d_{\text{эф}} = \varepsilon C N d_{\text{эф}} \quad (1.1)$$

где α - показатель поглощения вещества, см^{-1} ; ε - молярный коэффициент поглощения вещества в прозрачном растворителе, $\text{л}/\text{см}\cdot\text{моль}$; C - концентрация, $\text{моль}/\text{л}$; R - коэффициент отражения, измеряемый в опыте; $d_{\text{эф}}$ - эффективная толщина исследуемого образца, см ; N - число отражений.

В свою очередь, эффективная толщина зависит от возмущения амплитуды электрического поля на границе раздела сред с различными показателями преломления. Для массивного образца, толщина которого намного больше глубины проникновения затухающего поля, в случае плоскополяризованного света для перпендикулярной и параллельной компонент имеем соответственно:

$$d_{\text{эф}\perp} = 2d_p \cdot \cos\theta / (1 - n_{21}),$$

$$d_{\text{эф}\parallel} = d_{\text{эф}\perp} \{ (2\sin^2\theta - n_{21}) / [(1 + n_{21})\sin^2\theta - n_{21}] \} d_p, \quad (1.2)$$

где $n_{21} = n_2 / n_1$ - относительный показатель преломления, n_2 - показатель преломления вещества (в случае поглощения показатели преломления и поглощения связаны следующей зависимостью $n_2 = n_1 - ik_2$), n_1 - показатель преломления материала элемента МНПВО, θ - угол падения, d_p - глубина проникновения затухающего поля.

Изучение ориентации молекул отдельных компонентов микроорганизмов на поверхности ИЭ может быть выполнено путем анализа интенсивности полос поглощения в спектре МНПВО, полученном при разной поляризации плоскополяризованного света для какого-нибудь из углов θ . Наиболее удобно выполнить этот анализ для $\theta = 45^\circ$, так как при этом в случае изотропного распределения молекул $2d_{\text{эф}\perp} = d_{\text{эф}\parallel}$, а среднее значение $d_{\text{эф}} = (d_{\text{эф}\perp} + d_{\text{эф}\parallel})/2$ примерно равно d_p .

Оценка $d_{\text{эф}\perp}$ может быть проведена также по оптической плотности образцов из выражения:

$$D_{\perp} = -\lg R_{\perp}^N = \alpha \cdot N \cdot d_{\text{эф}\perp}. \quad (1.3)$$

Отсюда следует вывод, что по изменению оптической плотности D_{\perp} можно судить об изменениях эффективной толщины $d_{\text{эф}\perp}$ при разных направлениях поляризации источника излучения.

Перед проведением опыта необходимо было убедиться, что для выбранных экспериментальных условий выполняется последнее выражение. Использование этого выражения значительно облегчает аналитическую часть работы, т.к. позволяет воспользоваться линейной зависимостью D от величины $d_{\text{эф}}$.

Для более точной юстировки ИЭ под углом $\theta = 45^\circ$, кроме оптической юстировки, проверялось выполнение соотношения для изотропного образца для параллельной и перпендикулярной компонент электромагнитного поля световой волны $R_{\perp}^2 = R_{\parallel}$.

В качестве поляризатора в ИК области использовался пленочный реплика-поляризатор на основе полиэтилена с 1200 штрихов/мм; степень поляризации составляла 96%; пропускание поляризатора - 44%. Был произведен учет неполной поляризации света поляризатором.

Полученные результаты указывают на отклонение от изотропного распределения макромолекул в поверхностном слое, примыкающем к поверхностям ИЭ. Следовательно, при исследовании интактных клеток с помощью методов спектроскопии ИК необходимо учитывать ИК дихроизм отдельных полос поглощения компонентов клеток.

При работе в режиме ТП световой поток пронизывает три среды: материал ИЭ с показателем преломления n_1 , исследуемый объект с показателем преломления n_2 , и среду за

исследуемым объектом с показателем преломления n_3 . Измерения могут быть выполнены и в том случае, когда $n_1 < n_3$.

При использовании МНПВО для плоскополяризованного света при углах падения $\theta > \theta_{кр}$ выражения для $d_{эф}$ в случае тонкой пленки $[(2\pi d / \lambda_1) < 0,1$ и $K_2 < 0,1]$ записываются в виде:

$$d_{эф\perp} = 4n_{21} \cdot d \cdot \cos\theta / (1 - n_{31}^2) \quad (1.4)$$

$$d_{эф\parallel} = \{4n_{21} d \cos\theta [(1 - n_{32}^2) \sin^2\theta - n_{31}^2]\} / \{(1 - n_{31}^2) [(1 + n_{31}^2) \sin^2\theta - n_{31}^2]\},$$

где d - геометрическая толщина пленки ; n_{21}, n_{31}, n_{32} - относительные показатели преломления ; n_1, n_2, n_3 - показатели преломления ИЭ, исследуемого объекта и воздуха соответственно.

Значение $d_{эф}$ может в несколько раз превышать геометрическую толщину. Однако важно подчеркнуть, что при использовании спектроскопии МНПВО контраст спектра зависит не столько от $d_{эф}$, сколько от произведения $\epsilon \cdot d_{эф}$. Поскольку получаемая из опыта величина ϵ зависит от оптических свойств среды, в которой "растворена" исследуемая молекула, то интенсивность полос в спектре МНПВО будет зависеть от изменения показателя преломления в различных "срезах" (точках) микроорганизма. Подобный эффект влияния среды на молекулу известен в спектроскопии растворов, однако в спектральных исследованиях биологических объектов эти представления не используются. Такое положение, в частности, обусловлено неоднородным строением биологических объектов, в то числе и микроорганизмов, что сильно затрудняет применимость соответствующих представлений, используемых в случае изотропных гомогенных сред.

Из представленных выражений следует, что в случае работы с тонкой пленкой величина $d_{эф\parallel}$, может быть как больше, так и меньше $d_{эф\perp}$, в зависимости от того, будет ли отношение n_{32}^2/n_{31}^2 больше или меньше единицы, соответственно. Это условие накладывает определенные требования на выбор материала ИЭ, поскольку в режиме ТП можно получить практически любой эффект, который можно отнести к дихроизму даже в случае его отсутствия.

Для эксперимента были использованы измерительные элементы, выполненные из Ge, инфракрасного стекла ИКС-25, AgCl и из PbF₂. При использовании первых двух ИЭ выполняется соотношение $n_{32}^4/n_{31}^2 > 1$, а при использовании других двух - выполняется соотношение $n_{32}^4/n_{31}^2 < 1$.

Полученные экспериментальные результаты показывают, что когда представленное отношение < 1 формулы для $d_{эф}$, полученные для слабопоглощающих объектов, лучше соответствуют полученным результатам, чем при выполнении другого условия. Данные, полученные с помощью элементов из AgCl и PbF₂ отличаются друг от друга примерно на 3%, причем отклонение от значений, вычисленных по аппроксимированным формулам для элемента из PbF₂ составило около 5%, а для измерений на элементе из AgCl - 8%. Результаты, полученные с помощью элементов из Ge и ИКС-25 отличаются примерно на 10%, причем отклонение от значений, вычисленных по аппроксимированным формулам для измерений на элементе из инфракрасного стекла ИКС-25 составило около 20%, а для измерений, выполненных на элементе из германия - 30%. Такое расхождение полученных результатов относительно результатов, вычисленных по формулам (1.4), можно объяснить трудностью получения идеального режима тонкой пленки в случае анализа неразрушенных интактных клеток.

На практике может представиться, что клетки на рабочей поверхности ИЭ будут располагаться дискретно и в виде монослоя. Чтобы учесть возможность такого расположения объектов при количественных измерениях, следует выяснить, какому режиму работы (с МО или с ТП) будут соответствовать полученные результаты.

Запись спектров производилась с использованием ИЭ, которые применялись для работы с ТП и с использованием элементов из Ge и ИКС-24, которые были использованы для работы с МО. Для получения поляризованного света были использованы те же поляризаторы, что и в предыдущих экспериментах.

На основании полученных экспериментальных данных были вычислены отношения оптических плотностей для перпендикулярной и параллельной компонент плоскополяризованного света при угле падения 45° . Полученные отношения оптических плотностей при записи спектров на определенном измерительном элементе соответствуют отношениям оптических плотностей (при записи спектров на этом же элементе) в режиме МО или ТП. Следовательно, нарушения режима работы в рассматриваемом случае не наблюдается.

Особенности использования линейно поляризованного света, азимут поляризации которого отличен от 0° или 90° .

Рассмотрим случай, когда при взаимодействии света с клетками при многократном отражении возникает разность фаз между параллельным и перпендикулярным компонентами плоскополяризованного света.

Если линейно поляризованный под углом 45° к плоскости падения свет попадает на полностью отражающую поверхность, то он разделяется при полном внутреннем отражении на две равные по интенсивности компоненты с взаимно перпендикулярной поляризацией и с разностью фаз, которая зависит от угла падения светового потока и показателя преломления материала призмы ПВО:

$$\operatorname{tg}(\varphi/2) = (\cos\theta/\sin^2\theta)(\sin^2\theta - 1/n_1^2)^{1/2}, \quad (1.5)$$

При каждом дополнительном внутреннем отражении при тех же условиях разность фаз увеличивается на такую же величину. Таким образом, линейно поляризованный свет под углом 45° к плоскости падения, испытав полное внутреннее отражение, приобретая разность фаз между компонентами, становится эллиптически поляризованным. Когда разность фаз станет равной 90° , то свет становится поляризованным по кругу. Учитывая, что возможности метода НПВО, основанные на анализе эллиптической поляризации света, еще не выяснены, а вращение плоскости поляризации - является одним из экспериментальных методов исследования живых объектов, то возможные эффекты, которые могут возникнуть при взаимодействии света с интактными клетками в режиме МНПВО при указанной поляризации источника излучения, представляют не только практический интерес с точки зрения познания явлений, происходящих в клетках, но и которые необходимо учитывать при количественных измерениях.

Если мы изучаем поглощающую среду (в конкретном случае интактные клетки), то при известных n_1 , n_2 , K_2 и θ величину φ можно определить из таблиц или из выражении:

$$\operatorname{tg}\varphi = \sin\theta * \operatorname{tg}\theta \frac{\sqrt{2[(n_{212} - K_{22} - \sin^2\theta)^2 + 4 n_{212} K_{22}]^{1/2} - (n_{212} - K_{22} - \sin^2\theta)}}{\sin^2\theta * \operatorname{tg}2\theta - [(n_{212} - K_{22} - \sin^2\theta)^2 + 4 n_{212} K_{22}]^{1/2}}$$

Если считать, что материал, из которого изготовлен элемент МНПВО, свободен от всякого двулучепреломления, а разность фаз меняется с длиной волны, поскольку значение показателя преломления n_{21} есть функция длины волны, то при малых значениях K_2 и $\theta > \theta_{кр}$ величина φ слабо зависит от K_2 , что позволяет оценить φ в приближении прозрачной среды ($K_2 = 0$).

Если произвести расчет общего запаздывания разности фаз как функции длины волны для разных ИЭ с разным числом отражений для угла падения светового потока $\theta = 45^\circ$, и если линейно поляризованный луч, азимут поляризации которого относительно плоскости падения составляет 45° , нормально падает на входную плоскость ИЭ МНПВО, то возникает разность фаз между компонентами, увеличивающаяся от отражения к отражению. Эта

разность фаз при двух-трехкратном отражении достигает 90° , затем при увеличении числа отражений возрастает до 180° . Это означает, что вновь образуется линейно поляризованный луч, но направление его поляризации будет перпендикулярно направлению поляризации луча, падающего на входную площадь ИЭ МНПВО.

Можно также предположить, что разность фаз, полученная расчетным путем из рассмотренных выше выражений, в опыте будет отличаться, так как ПВО происходит на границе раздела двух сред, где низкопреломляющей средой являются такие сложные объекты как нативные клетки.

Зависимость изменения величины φ от числа отражений при азимуте поляризации 45° линейно поляризованного луча и параметров измерительного элемента МНПВО можно получить путем преобразования и других уравнений, приведенных в литературе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, при заданных значениях n_1 , n_2 , K_2 и θ можно рассчитать d_{φ} в зависимости от N . Результаты расчета относительного изменения d_{φ} от числа отражений в случае изотропного объекта представляют собой линейную зависимость, проходящую через начало координат, и представляет зависимость относительного изменения d_{φ} от числа N , полученную из эксперимента для массивного образца клеток.

Анализ таких зависимостей показывает, что при азимуте поляризации 45° линейно поляризованного луча необходимо знать число отражений измерительного элемента и относительный показатель преломления.

Следует также учитывать, что луч, попадающий на фотоприемник, несет в себе информацию, определяемую различной эллиптичностью, которая, в свою очередь, зависит от числа полных внутренних отражений, т.е. сигнал, который мы записываем с помощью регистрирующего устройства, представляет при многократном отражении сложную зависимость. Поэтому при количественных измерениях в режиме МНПВО следует работать не только с поляризованным источником излучения, но и точно знать азимут поляризации линейно поляризованного луча.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Гусев М.В., Королев Ю.Н.** О взаимосвязи эволюции живых систем и их «открытости». Синергетика, т.7, М., МГУ, 2004. - С. 150-169.
2. **Королев Ю.Н., Малахов Ю.И., Калабеков А.Л.** Использование методов спектрометрии МНПВО для анализа биологических объектов// Измерительные технологии, №8, 2002. - С. 6-14.
3. **Калабеков А.Л., Королев Ю.Н.** 2000. Экологический мониторинг. Некоторые методы неинвазивного анализа интактных клеток. М. 180 с.
4. **Харрик Н.** 1970. Спектроскопия внутреннего отражения. М. 335 с.

M.V. Goncharova ¹, S.S. Safonov ¹, R.R. Aslanyan ²

¹Mezhdunarodny University of Nature Society and Man "Dubna" branch "Ugresha", Russia, 1400093, Moscow Region, Dzerzhinsky. Street Academy Zhukova, 24, E-mail: mariy-goncharov@yandex.ru

² Moscow State University named after MV Lomonosov Moscow State University, 119991, Russia, Moscow, Lenin Hills, Moscow State University, 1, page 12, Department of Biology, E-mail: mariy-goncharov@yandex.ru

FEATURES POLARIZATION ANALYSIS OF INTACT CELLS ABSTRACT

Functional changes in the properties of communities associated with changes in structure, and individual structural indicators although reflecting the features of this communication, but by themselves are not sufficient to fully describe it. However, in the particular context of this change affect the physiological state of individual populations in the operation of general habitat with limited food reserves. All this leads to the need to find such a generalized measure that, given the structural characteristics of the community, in this case reflects the features of its physiological state, ie the problem is reduced to obtaining such a function with which the measured or calculated by the structural indicators \rightarrow community can determine its physiological activity.

Application of generalized dimensionless parameters of the structure and function reflects the result of effects on the community of the totality of environmental factors (nutrition security, space, light, etc.), so that their use appears to be more successful than a search for private connections between individual environmental factors and functional performance of the system.

**POLARIZED LIGHT, STRUKTURASOBSCHESHTVA, INTACT CELLS
OBOBSCHNNEY DIMENSIONLESS INDEX, LUMINESCENCE DICHROISM
OPTICHESKAYAYU ACTIVITY, BIREFRINGENCE**