

# СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ БИОФИЗИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ



## Практикум по биофизике

---

Под ред. А. Б. Рубина

Допущено Министерством  
высшего и среднего  
специального образования СССР  
в качестве учебного пособия  
для студентов биологических  
специальностей университетов



МОСКВА • ВЫСШАЯ ШКОЛА • 1988

ББК 28.071 973

С 56

УДК 577.3

**А. А. Булычев, В. Н. Верхотуров, Б. А. Гуляев, Г. Т. Гурия,  
И. И. Иванов, Н. П. Королев, В. З. Пашенко,  
Г. Ю. Ризниченко, А. Б. Рубин, Г. В. Сумаруков,  
К. Н. Тимофеев, И. В. Упоров, К. В. Шайтан**

**Рецензенты:**

кафедра физики живых систем Московского физико-технического института (зав. кафедрой — проф. Э. М. Трухан); проф. В. Ф. Антонов (1-й Московский медицинский институт имени И. М. Сеченова)

**С56** **Современные методы биофизических исследований:**  
Практикум по биофизике: Учеб. пособие для биол. спец. вузов / А. А. Булычев, В. Н. Верхотуров, Б. А. Гуляев и др.; Под ред. А. Б. Рубина. — М.: Высш. шк., 1988. — 359 с.: ил.  
ISBN 5-06-001197-6

В книге изложены теоретические основы современных биофизических методов и пути их практического применения. Рассмотрены спектральные методы, методы исследования модельных и биологических мембран, калориметрические методы, методы магнитного резонанса, рентгеноструктурного анализа, математические методы в биологии. Практикум разработан на основе учебника А. Б. Рубина «Биофизика» в двух томах.

С 2001040000(4309000000)—207  
001(01)—88 94—88

ББК 28.071  
57.04

ISBN 5-06-001197-6

© Издательство «Высшая школа», 1988

## Предисловие

Освоение современных высокочувствительных методов исследования молекулярных механизмов биологических процессов входит в программу курса биофизики и занимает в ней важное место. Вместе с тем постоянное развитие методической базы биофизики приводит к появлению новых приборов, что затрудняет их детальное изучение в рамках существующих программ и учебных часов. Отличительная особенность данного практикума по биофизике состоит в том, что в нем сделан акцент не на изложение большого числа задач, а на раскрытие физико-химических основ каждого из методов и особенностей их использования в биологических исследованиях. Такой подход направлен на формирование у студентов фундаментальных представлений, что должно дать им возможность использовать эти методы в дальнейшей работе.

Учебное пособие создано на основе большого практикума, который проходят студенты на кафедре биофизики биологического факультета МГУ. Он включает главным образом современные методы, получившие свое развитие в биофизике в последние годы и требующие для своего освоения углубленных знаний по физико-математическим дисциплинам. В написании участвовали преподаватели и научные сотрудники кафедры, имеющие большой опыт преподавания и осуществляющие разработку и совершенствование методов биофизических исследований и задач практикума. В книге широко представлены материалы по спектральным методам исследования (Б. А. Гуляев), лазерной спектроскопии (В.З. Пашенко), методам изучения ионной проницаемости биологических мембран (А.А. Булычев), радиоспектроскопии (К. Н. Тимофеев, К. В. Шайтан), автоматизации биофизических исследований (В. Н. Верхотуров), математическому моделированию (Г. Ю. Ризниченко), калориметрическим методам (И. И. Иванов). В книгу включен раздел, посвященный изучению монослоев липидов (Н. П. Королев, Г. В. Сумаруков), а также использованы программы для обработки информации и расчетов (Г.Т. Гурия, И. В. Упоров), которые применяются студентами в практикуме.

*Авторы*

## Введение

Основная тенденция современной биофизики состоит в проникновении на самые глубокие молекулярные уровни структурной организации живого. Изучение физической и физико-химической природы элементарных взаимодействий, лежащих в основе биологических явлений, составляет *основной предмет биофизики*. В число проблем, которыми активно занимается биофизика, входят: механизмы регуляций сложных биологических систем, мембранные процессы транспорта и биоэлектрогенеза, ферментативный катализ, молекулярные механизмы трансформации энергии в фотобиологических, биоэнергетических, механохимических процессах, механизмы рецепции.

В настоящее время становится все более ясным, что существуют общие принципы, которым подчиняются взаимодействия в активных макромолекулярных комплексах и которые обуславливают эти различные по своей биологической роли процессы и явления.

Согласно *концепции электронно-конформационных взаимодействий*, направленные конформационные превращения, индуцированные в результате изменения электронных свойств макромолекул, лежат в основе их функционирования в биологических системах. Своеобразие макромолекулы как физического объекта состоит в тесном сочетании статистических и детерминистских степеней свободы, что накладывает глубокий отпечаток на механизмы элементарных взаимодействий в активных макромолекулярных комплексах.

На современном этапе развития биофизики стало также ясно, что для понимания природы молекулярных механизмов и построения адекватных физических моделей необходимо иметь сведения о реальных молекулярных свойствах биологического объекта, полученных непосредственно в прямых экспериментах. Именно в этом случае удастся связать характеристики первичных молекулярных механизмов с особенностями конкретных биологических процессов и явлений, что, собственно, и составляет *основную задачу биофизики*. Отсюда вытекает принципиальная роль экспериментальных методов в биофизике, которые дают возможность получать прямую информацию о механизмах молекулярных процессов в интактных биологических объектах. Следует отметить, что развитие биофизики всегда было неразрывно связано с разработкой новых экспериментальных,

а также теоретических методов исследования, основанных главным образом на современных достижениях физики, математики, физической химии. В свое время применение физико-химических представлений теории растворов, принципов химической кинетики, измерения электрических параметров клеток и тканей было основано на точных методах, которые проникали затем в другие области экспериментальной биологии.

Этот процесс происходит и в настоящее время, когда на вооружение в биофизике взяты различные современные методы: оптические, радиоспектроскопические (ЯМР-, ЭПР-, ЯГР-спектроскопия), люминесценция, лазерная спектроскопия, математическое моделирование, автоматизация эксперимента и обработки информации, микроэлектродные, калориметрические и целый ряд других. Использование этих методов для анализа свойств биологического объекта, как правило, требует проведения их глубокой модификации, связанной с повышением чувствительности, точности измерений, введением специальных моделей и приемов для обработки получаемой информации.

В предлагаемой читателям книге рассмотрены некоторые современные методы исследований, которые активно развиваются в настоящее время в ведущих биофизических лабораториях и которые еще далеко не все нашли свое воплощение в стандартных промышленных приборах. Их использование в научной работе дает ощутимые преимущества коллективам, которые их самостоятельно разрабатывают. Знакомство с принципами и физическими основами новых методов необходимо для понимания достижений современной биофизики, биохимии, молекулярной биологии, биоорганической химии.

Главное внимание в книге уделено теоретическим основам применения новых методов, которые позволяют получать информацию, о строении и внутримолекулярной динамике биомакромолекул, связанных с механизмами первичных биологических процессов. Сюда относятся прежде всего широкий набор спектральных методов исследования структуры биополимеров, включающих абсорбционную, в том числе производную, поляризационную, люминесцентную спектрофотометрию, лазерную спектроскопию биологических объектов. Наряду с ними в книге рассмотрены также методы изучения ионных каналов, калориметрические методы, а также методы исследования биополимеров и мембранных систем и методы магнитного резонанса (электронный парамагнитный, ядерный магнитный, ядерный гамма-резонанс), которые находят все более широкое применение в биологии. Подробно рассматриваются вопросы математического моделирования биологических процессов и автоматизации исследований в биофизике с помощью ЭВМ.

## Глава I

### Спектральные методы исследования стационарных свойств биологических систем



Для исследования свойств биологических систем и макромолекул широко применяют различные *спектральные методы*. Различают оптические методы для изучения *стационарных характеристик* биологических объектов, когда за время измерения не происходит изменений регистрируемых параметров, и *динамических характеристик*, изменяющихся во времени в процессе их регистрации вследствие протекающих в системе нестационарных процессов (в том числе и тех, которые могут быть индуцированы светом в процессе измерения). Оптическими методами могут быть изучены разнообразные свойства и реакции биологических систем, среди которых большое значение имеют фотобиологические процессы, происходящие под действием света в широком спектральном диапазоне (от ультрафиолетовой до инфракрасной области). Основные параметры светового излучения: частота  $\nu$  и длина волны  $\lambda$ , энергия кванта света  $E = h\nu$  ( $h$  — постоянная Планка) и интенсивность излучения  $I = nE$  ( $n$  — число квантов в световом потоке). Энергия кванта связана с длиной волны (нм) соотношениями  $E_{\text{Дж}} = 1,2 \cdot 10^8 / \lambda$  и  $E_{\text{эВ}} = 1234 / \lambda$ , где  $E_{\text{Дж}}$  выражена в Дж/моль,  $E_{\text{эВ}}$  — в электрон-вольтах ( $\nu$  выражается в  $\text{см}^{-1}$ ). Поскольку фотобиологические реакции протекают при поглощении квантов света, очевидно, что энергия квантов, вызывающих фотопроцесс, например, в видимой области спектра, составляет 170—340 кДж/моль. Таким образом, эта энергия значительно превышает энергию макроэргической связи АТФ, которая приблизительно равна 30—42 кДж/моль.

Для исследования стационарных свойств биологических объектов широко используют разнообразные методы, в том числе абсорбционную спектрофотометрию. Существуют различные модификации классического абсорбционного метода, включающие дифференциальную, производную и поляризационную абсорбционную спектрофотометрию, измерение оптической активности (оптического вращения, эллиптичности, кругового дихроизма, двулучепреломления) и т. п. Регистрируемые при этом спектральные параметры поглощения (положение полос, их знак, интегральная интенсивность в спектре и полуширина) дают информацию о качественном составе и количественном соотношении компонентов биологической системы, их состоянии и структурной организации.

Однако несмотря на успешное развитие спектрофотометрической аппаратуры, изучение спектральных свойств биологических объектов встречает ряд трудностей. Некоторые из них имеют методический характер и связаны со специфическими оптическими свойствами биологических объектов (сильное светорассеяние, слишком большая или, наоборот, слишком малая величина оптической плотности, светочувствительность образцов, гетерогенность исследуемого препарата и т. п.). Существуют различные методические приемы для преодоления указанных трудностей, основанные на применении как стандартной, так и специально разработанной аппаратуры с высокочувствительными светоприемниками — фотоумножителями, интегрирующими сферами или компенсирующими светорассеяние пластинками и т. д. В ряде случаев светорассеяние частично снимается добавлением к объекту веществ, увеличивающих показатель преломления среды (например, сахарозы, глицерина), что приводит к уменьшению разницы показателей преломления буферного раствора и рассеивающих частиц (митохондрий, хлоропластов, клеток водорослей или бактерий и т. п.). В некоторых случаях удается ввести поправки на светорассеяние путем экстраполяции из спектральной области, где поглощение практически отсутствует, на область полосы поглощения.

В спектр поглощения биологического объекта (представляющего собой многокомпонентную систему) вносят вклад различные химически индивидуальные компоненты. Более того, каждый компонент системы может находиться в различных модификациях (конформационных состояниях, ассоциатах, агрегатах и т. п.), отличающихся своими спектральными свойствами (количеством полос поглощения, их интенсивностью, полушириной и положением в спектре). Вследствие указанных причин измеряемая спектральная кривая представляет собой результат наложения (суперпозиции) кривых поглощения многих компонентов и обычно имеет сложную форму. При этом максимумы, характерные для индивидуальных компонентов системы, могут либо вообще не обнаруживаться на суммарной кривой, либо проявляться в виде слабовыраженных выступов, «плеч», перегибов и т. п.

Из-за сложного характера суперпозиции отдельных полос на суммарной кривой могут иногда проявляться так называемые «ложные» максимумы, которые не соответствуют ни одному из реальных компонентов исследуемой биологической системы. Отсюда следует, что задача точной идентификации компонентов и их количественного определения в биологической системе достаточно сложна. Для ее решения необходимо разложение исходного спектра на составляющие (или расчет доли поглощения каждого из веществ при различных длинах волн), как правило, с использованием данных производной абсорбционной спектроскопии, а также информация о коэффициентах поглощения таких компонентов.

## § 1. Основы метода абсорбционной спектроскопии

Методы измерения пропускания или поглощения света по своей сути всегда являются *дифференциальными*, поскольку оптические свойства исследуемого объекта всегда сравниваются с контрольным образцом. В том случае, если контрольный образец (например, растворитель) не поглощает в исследуемой спектральной области, дифференциальный метод измерения поглощения переходит в *абсолютный*, или, иными словами, в метод непосредственной спектроскопии.

На рис. 1 представлена принципиальная схема наипростейшей однолучевой установки для измерения поглощения. При нормальном падении света на образец, толщина которого  $dI$  мала, интенсивность света в пределах этого слоя практически постоянна, т. е.

$$-dI/I = \epsilon' c dl. \quad (1)$$

Это означает, что доля поглощенного света пропорциональна числу поглощающих молекул. Коэффициент пропорциональности  $\epsilon'$ , называемый *коэффициентом молярной экстинкции*, не зависит от концентрации молекул (при отсутствии взаимодействия между ними) и является функцией длины волны света. Отношение  $I/I_0 =$

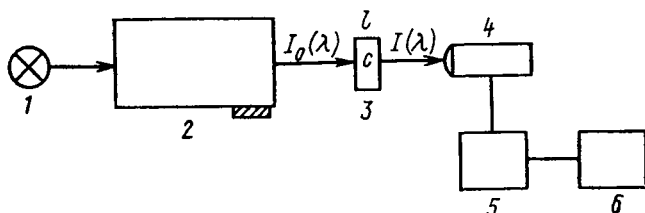


Рис. 1. Схема однолучевой установки для измерения поглощения:

1 — источник света, 2 — монохроматор, 3 — кювета с образцом, 4 — фотоумножитель, 5 — усилитель фототока, 6 — самопишущий потенциометр;  $I_0(\lambda)$  и  $I(\lambda)$  — интенсивности падающего и прошедшего образцом света,  $l$  — длина оптического пути,  $c$  — концентрация



$T$  называется величиной пропускания,  $\lg(I_0/I) = D = -\lg T$  — оптической плотностью.

Оптическая плотность  $D$  пропорциональна концентрации поглощающего вещества и длине оптического пути, величина пропускания  $T$  или величина поглощения  $(1 - T) = (I_0 - I)/I_0$  не пропорциональны концентрации. По этой причине для определения концентрации объекта и его абсорбционных характеристик обычно используют оптическую плотность. Зависимость оптической плотности от длины волны (или частоты) света, падающего на объект, называется спектром поглощения:  $D = f(\lambda) = \epsilon(\lambda)cl$  ( $\epsilon' = 2,303 \epsilon$ ).

При работе с чистыми веществами приводят величины  $D$  к стандартным условиям ( $l = 1$  см,  $c = 1$  моль/л), что сразу позволяет найти величину  $\epsilon$ . Спектр поглощения в этом случае представляет собой функцию  $\epsilon = f(\lambda)$ . Измерение оптической плотности (и спектров поглощения) целесообразно производить в диапазоне от 0,1 до 1  $D$  [желательно при значениях порядка (0,3—0,5)  $D$ ], поскольку при  $D \geq 1$  величина  $(1 - T) = 1 - 10^{-D}$  близка 100 % и на детектор будет попадать слишком мало света, а при  $D \leq 0,1$  сам образец — поглощать незначительную долю падающего света.

Если исследуемая система представляет собой смесь поглощающих свет компонентов, то суммарная оптическая плотность объекта равна сумме оптических плотностей каждого из компонентов, поскольку интенсивность света, пропущенного объектом в этом случае, равна  $I = I_0 T_1 T_2 \dots T_n$  и  $\lg(I_0/I) = D = -\lg T_1 - \lg T_2 \dots - \lg T_n = D_1 + D_2 + \dots + D_n$  (где  $n$  — число компонентов). Максимальные значения молярных коэффициентов экстинкции  $\epsilon_{\max}$  для различных хромофоров варьируют в пределах  $1-10^6$  (моль/л) $^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ .

Молярный коэффициент экстинкции связан с молекулярным коэффициентом поглощения  $K$  соотношением  $\epsilon'c = Kn$ , где  $n$  — число молекул,  $\text{см}^3$  ( $K = 3,8 \cdot 10^{-21} \epsilon$ );  $K$  выражается в  $\text{см}^2$ . Так как  $-dI/I = \epsilon'c dl = Kdn$  (где  $dn$  — число молекул в тонком слое  $dl$ ), то это означает, что каждая молекула поглощает определенную долю света, падающего на слой  $dl$ , равную  $K$ . Таким образом, если принять, например, для хромофора  $\epsilon_{\max} \approx 10^6$ , то, поскольку  $K = 3,8 \cdot 10^{-21} \epsilon$  получим, что из падающей на 1  $\text{см}^2$  световой энергии каждой молекулой поглощается лишь  $10^{-16}$ , т. е. каждая молекула как бы эквивалентна светонепроницаемой площади  $10^{-16} \text{см}^2$ .

Такая эффективная площадь называется *эффективным сечением поглощения молекулы*  $\sigma$  для данной длины волны света  $\lambda$ . При молярной концентрации вещества  $c$  число молекул в 1  $\text{см}^3$  составляет  $cN_A/1000$ , где  $N_A$  — число Авогадро. Связь между коэффициентом экстинкции и сечением поглощения молекулы (ее эффективным размером) такова:  $\epsilon = \sigma N_A/2,303$ . При аппроксимации площади молекулы площадью круга ( $\pi R^2$ ) и вероятности поглощения света молекулой ( $p$ ) величина  $\epsilon = p\pi R^2 N_A/2,303$ .

Для установления взаимосвязи между коэффициентом экстинкции и молекулярными свойствами исследуемого объекта необходима информация о таких важных молекулярных параметрах, как сила осциллятора  $f_{ij}$  и дипольная сила перехода  $D_{ij}$ . Сила осциллятора электронного перехода служит мерой интенсивности поглощения и определяется вероятностью перехода молекулы из основного  $i$  состояния в возбужденное  $j$ . Сила осциллятора пропорциональна квадрату момента перехода  $\mu_{ij}$ , который называется дипольной силой:  $D_{ij} = |\mu_{ij}|^2$ . Момент перехода — молекулярный параметр, определяющий вероятность ( $i - j$ )-перехода. Момент каждого данного перехода оказывается ориентированным определенным образом относительно осей молекулы. Его представляют в виде вектора в координатах, задаваемых положениями ядер атома.

Силу осциллятора можно связать с экспериментально определяемыми коэффициентами экстинкции:  $f_{ij} = 4,32 \cdot 10^{-9} \int_{\nu_1}^{\nu_2} \epsilon(\nu) d\nu$ . Здесь

$\int_{\nu_1}^{\nu_2} \epsilon(\nu) d\nu$  — интегральный молярный коэффициент экстинкции, равный площади под кривой поглощения (интегрирование производят по всем частотам в пределах данной полосы). Таким образом, сила осциллятора пропорциональна площади под кривой соответствующей полосы поглощения. В случае неперекрывающихся симметричных полос интегральный молярный коэффициент экстинкции приближенно равен произведению  $\epsilon(\nu)_{\max}$  на ширину полосы поглощения ( $\text{см}^{-1}$ ) на уровне половины максимального значения коэффициента поглощения (полуширины полосы поглощения  $\Delta\nu_{1/2}$ ), т. е.  $f_{ij} \approx 4,32 \cdot 10^{-9} \epsilon(\nu)_{\max} \Delta\nu_{1/2}$ .

Сила осциллятора — величина безразмерная и представляет собой отношение наблюдаемой интенсивности поглощения к интенсивности (квадрату амплитуды) осциллирующего заряда электрона классической модели (для трехмерного гармонического осциллятора). Силы осциллятора для различных полос варьируют от существенно малых значений до величин порядка 0,1—1,0 и связаны с соответствующими дипольными силами следующим соотношением:

$$f_{ij} = \frac{8\pi^2 m c \nu}{3 h e^2} D_{ij},$$

где  $m$  и  $e$  — масса и заряд электрона,  $D_{ij} = 9,18 \cdot 10^{-3} \int_{\nu_1}^{\nu_2} \frac{\epsilon(\nu)}{\nu} d\nu$  (дебай)<sup>2</sup>. Дипольная сила позволяет определить величину момента перехода  $|\mu_{ij}|$ , которая выражается в дебаях и для интенсивных полос поглощения обычно составляет несколько дебай. Так как  $D_{ij} = |\mu_{ij}|^2$ , то вычисленное значение  $|\mu_{ij}|$  не дает информации об ориентации соответствующего момента перехода относительно осей молекулы.

Измерение спектра поглощения по своей сути является дифференциальным (всегда измеряется разность оптических плотностей  $\Delta D$  между контрольным и опытным образцами при данной длине волны или при разных значениях  $\lambda$ ). Так как  $\Delta D = \lg(I_1/I_2)$ , где  $I_1$  и  $I_2$  — интенсивность света, прошедшего через один и другой образцы, то для регистрации  $\Delta D$  нет необходимости измерять интенсивность падающего света. *Прямые измерения разностных (дифференциальных) спектров поглощения* (непосредственная регистрация  $\Delta D = f(\lambda)$ , а не вычитание одного измеренного абсолютным методом спектра из другого) существенно увеличивают точность и позволяют выявить различия, которые практически не проявляются при вычитании спектров. Это связано прежде всего с тем, что при дифференциальном методе измерения возможно использование более высоких значений оптических плотностей сравниваемых образцов. При этом точность измерений будет пропорциональна  $\Delta D$ , при равенстве концентраций исследуемых объектов (различающихся, например, своим состоянием) и длины оптического пути:  $\Delta D = c(\epsilon_1 - \epsilon_2)$ . В этом случае, если необходимо определить концентрацию вещества в растворе  $c$ , зная его исходную концентрацию  $c_0$  в том же растворителе,  $\Delta D = \epsilon l(c - c_0)$  и  $c = c_0 + [1/(\epsilon l)]\Delta D$  ( $\Delta D$  при этом может иметь как положительные, так и отрицательные значения).

Существует выражение для вычисления относительной ошибки определения оптической плотности ( $\Delta D_c/D_c$ ) или концентрации ( $\Delta c/c$ ):

$$\Delta c/c = \Delta D_c/D_c = -0,434 (\Delta T)/(D_c \cdot 10^{-\Delta D}),$$

так как  $\Delta D = D - D_0 = \epsilon l(c - c_0)$ ,  $\lg \Delta T = -\Delta D = -\epsilon l(c - c_0)$  и  $dc = -[1/(\epsilon l)] (0,434/\Delta T) d\Delta T$ . Оптимальная величина  $\Delta D$ , соответствующая минимальной ошибке измерения, определяется выражением  $\Delta D = 0,434 - D_0$ , т. е. ошибка измерения  $\Delta D$  уменьшается при возрастании  $D_0$ . Таким образом, точность измерения может быть повышена за счет увеличения концентрации контрольного и опытного образцов при том условии, что значения этих концентраций близки.

При увеличении  $D_0$  оптимальная величина  $\Delta D$  уменьшается от значения 0,434 до 0. Зависимость относительной ошибки ( $\Delta D_c/D_c$ ) от измеряемой величины оптической плотности ( $D_c$ ) показывает, что оптимальной областью для измерения является область, где значение оптической плотности находится в диапазоне  $(0,2 - 0,7)D$ . Обычно измерение разностных стационарных спектров поглощения производят на двухлучевых дифференциальных спектрофотометрах (рис. 2).

Луч света, проходя монохроматор с помощью специального устройства, расщепляется на два одинаковых луча. Эти лучи через модулятор последовательно попадают на две одинаковые кюветы, в одной из которых находится опытный образец, а в другой — образец сравнения (контроль). После прохождения через образцы свет попадает на приемник излучения (фотоэлемент

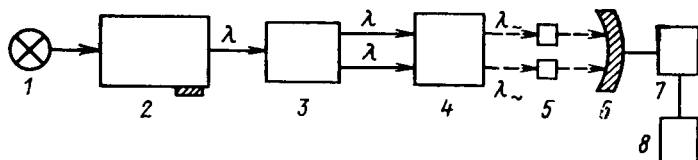


Рис. 2. Схема дифференциального двухлучевого абсорбционного спектрофотометра:

1 — источник света, 2 — монохроматор, 3 — система расщепления светового луча, 4 — система модуляции, 5 — образцы (контрольный и опытный), 6 — приемник света, 7 — усилитель фототока, 8 — система регистрации

или фотоэлектронный умножитель) и, преобразуясь в фототок, усиливается, а затем регистрируется самопишущим потенциометром. Обычно разделение лучей производится с помощью полупрозрачных или непрозрачных неподвижных зеркал и интенсивность каждого луча составляет примерно половину от общей интенсивности. Модуляция световых потоков осуществляется с помощью специальных прерывателей, которые представляют собой дисковые или цилиндрические устройства с вырезами, вращающиеся с определенной частотой (скоростью). Разделение лучей может осуществляться и с помощью пары поляризационных призм, а модуляция в этом случае может производиться вращением одной из призм. Однако при этом происходят значительные потери света, а интенсивность расщепленных пучков отличается в различных участках спектра. В наиболее современных спектрофотометрах модулятор света одновременно служит и делителем. Это достигается использованием вращающихся или вибрирующих зеркал (или специальных кварцевых пластинок). Такие системы позволяют избежать существенных потерь в интенсивности света после его расщепления и модуляции.

Для измерения дифференциальных (разностных) спектров поглощения биологических объектов, рассеивающих свет, применяют спектрофотометры с интегрирующими сферами. В этом случае объекты помещают в сферу, внутренняя поверхность которой покрыта специальным веществом с высоким коэффициентом отражения (например, MgO). Рассеянный объектом свет многократно отражается от стенок сферы и затем через специальное окно в сфере попадает на светоприемник. Такая система применяется в отечественных двухлучевых спектрофотометрах СФ-10, СФ-14, СФ-18, имеющих двойной монохроматор, систему расщепления и модуляции. Лучи после разделения модулируются с частотой 50 Гц, однако перекрываются они попеременно. Вследствие этого при равенстве интенсивности лучей в сферу, расположенную за кюветным отделением, попадает немодулированный равномерный световой поток. В том случае, если лучи различаются по интенсивности, из-за разницы в поглощении образцов будет возникать переменная составляющая фототока. Величина разбаланса, приведенная к показаниям оптической плотности  $D$  или коэффициента пропускания  $T$ , регистрируется потенциометром, компенсирующим возникающий сигнал и приводящим в движение перо самописца.

Для измерения разностных спектров поглощения при низких температурах (например, при 77 К, что часто необходимо для разре-

шения тонкой структуры спектров исследуемых объектов) могут быть применены специальные пластиковые кюветы, помещаемые на держателях в сосуды Дьюара, заполненные жидким азотом, которые в свою очередь располагаются внутри интегрирующей сферы. Образцы обычно готовят в буферно-глицериновых смесях, что дает возможность получить при пониженной температуре стеклующиеся препараты.

## § 2. Повышение разрешающей способности при измерении спектров поглощения и необходимый предел разрешения

Успешный анализ спектральной кривой поглощения зависит от того, насколько точно зарегистрирован спектр исследуемого объекта. Это во многом определяется разрешающей способностью и чувствительностью используемого спектрофотометра. Повышение реальной разрешающей способности требует применения спектрофотометра при измерении спектра исследуемого объекта. Поскольку сужение входной и выходной щелей монохроматора одновременно приводит и к уменьшению измеряемого светового потока (примерно обратно пропорционально квадрату ширины щели), а следовательно, к понижению чувствительности и точности измерений, необходимо оценить нижнюю границу спектрального интервала при измерении спектра поглощения.

Ширина спектрального интервала, выделяемого монохроматором, в первом приближении может быть определена как произведение его обратной линейной дисперсии  $1/D$  (нм/мм) на геометрическую ширину щели монохроматора  $S$  (мм). Экспериментально и с достаточной точностью та же величина может быть определена как полуширина полосы, полученная при записи очень узкой спектральной линии (например, линии эмиссионного спектра Hg или Fe). Выбор спектральной ширины щели ( $\Delta\lambda \approx S/D$ ) определяется данными о полуширине измеряемой полосы.

Для практических целей обычно принимают, что в случае полос, контур которых описывается гауссовой кривой, спектральный интервал, выделяемый монохроматором, должен быть на порядок или по крайней мере в 6—7 раз меньше полуширины измеряемой полосы. Так, при измерении спектров поглощения ряда фотосинтезирующих объектов в красной и инфракрасной (ИК) области спектральная ширина щели должна составлять около 1—1,5 нм. Если проводимые измерения не связаны с изучением тонкой структуры спектра, спектральная ширина щели может составлять 3—4 нм, что существенно уменьшит требования к чувствительности используемой установки. Спектральная ширина щели может быть увеличена и в том случае, если измерения проводятся преимущественно в ультрафиолетовой (УФ) или коротковолновой (КВ) (для видимого диапазона) области спектра. Спектр поглощения биологических объектов

часто состоит из нескольких близко расположенных полос, и возможность их раздельного наблюдения (разрешения) при достаточно точном измерении контура каждой полосы зависит от полуширины полос и расстояния между ними.

В качестве количественного критерия разрешения обычно принимают, что две полосы равной интенсивности и полуширины (так называемый *симметричный дублет*) могут считаться разрешенными, если величина «провала» между ними на суммарной кривой составляет не менее половины максимальных значений (*критерий Рэлея*). Согласно менее жесткому критерию, правомерность применения которого экспериментально оправдана усовершенствованием техники измерений, для разрешения симметричного дублета достаточно обнаружить лишь существование самого «провала» между полосами. Теоретически это условие выражается в равенстве нулю второй производной в точке суммарной спектральной кривой, соответствующей центру дублета.

Предложенный критерий позволяет найти соотношение, связывающее полуширину индивидуальной полосы  $\Delta X$  и минимальное расстояние между полосами, измеряемое между их максимумами ( $\Delta v = K\Delta X$ ), при котором еще возможно разрешение (обе величины выражают в  $\text{см}^{-1}$ ). В соответствии с критерием разрешения для полос, контур которых описывается кривой Гаусса  $\Delta v = 0,849 \Delta X$ , для полос лоренцевского типа  $\Delta v = 0,557 \Delta X$ . Это означает, что две гауссовы полосы (в случае симметричного дублета) могут быть разрешены, если расстояние между ними ( $\Delta v$ ) составляет 0,849 их полуширины. При использовании более строгого критерия (критерий Рэлея) для разрешения таких полос необходимо, чтобы они были раздвинуты на расстояние, составляющее около 1,5 их полуширины.

Для более общего случая, когда в спектре имеется свыше двух полос, различающихся также своими полуширинами и интенсивностями (амплитудами), соответствующие критерии разрешения пока не разработаны. Для анализа таких сложных спектральных кривых и разработки критериев разрешения целесообразно применение вычислительной техники. Приведенные выше факты позволяют прийти к выводу, что существуют определенные пределы, ограничивающие разрешение максимумов, а следовательно, и возможность раздельного исследования компонентов спектров поглощения и не связанные с аппаратными возможностями абсорбционных спектрофотометров.

Такие ограничения определяются уже не спектральной шириной щели и чувствительностью установки, а обусловлены самим характером спектра, состоящим, например, из нескольких близко расположенных и сильно перекрывающихся индивидуальных полос поглощения с различной интенсивностью и полушириной.

В настоящее время предложены способы, которые позволяют существенно увеличить реальную разрешающую способность

спектральных измерений. Одним из таких способов служит понижение температуры объекта (вплоть до температуры жидкого азота или гелия), которое сопровождается сужением полос поглощения, что приводит к улучшению разрешения (можно выявить тонкую структуру спектра), другой способ основан на разработке специальных методов (так называемой производной спектрофотометрии).

### § 3. Основные принципы производной спектрофотометрии и методы измерения производных спектров

Спектры поглощения биологических объектов, как было указано выше, обычно представляют собой сложные кривые, являющиеся суперпозицией спектров индивидуальных компонентов. Структура спектров часто проявляется в виде «плеч», перегибов или асимметрии полос. Все эти элементы структуры в ряде случаев весьма слабо выражены.

Попытки разложения суммарных спектров на индивидуальные компоненты без привлечения независимых экспериментальных данных о числе компонентов, полуширинах, амплитудах и положении полос приводят к тому, что характеристики и количество получаемых при этом компонентов могут не отвечать реальной ситуации. Неопределенность разложения измеренного спектра поглощения на компоненты существенно уменьшается, если с помощью какого-либо экспериментального метода получены данные о возможном числе индивидуальных полос и тех пределах, в которых локализованы значения их параметров. Этим целям служит *метод производной спектрофотометрии*, представляющий собой разновидность дифференциального метода и позволяющий за счет повышения разрешающей способности более отчетливо выявлять структуру спектра, а в ряде случаев оценивать число и параметры индивидуальных полос.

Метод производной спектрофотометрии заключается в непосредственном измерении разницы оптических плотностей для двух монохроматических лучей  $\lambda_1$  и  $\lambda_2$ , разделенных узким спектральным интервалом  $\Delta\lambda$  ( $\Delta\lambda = \lambda_2 - \lambda_1$ ). В этом заключается основное отличие этого метода от дифференциального, когда либо сравнивается поглощение света одной и той же длины волны (*двухлучевой метод*) для двух разных объектов (или одного и того же образца в двух различных состояниях), либо сопоставляется поглощение объектом двух существенно различающихся по длине волны световых лучей (*двухволновый метод*, см. далее). В случае производной спектрофотометрии непосредственное измерение разности оптических плотностей (дифференциальный принцип) для двух близких длин волн дает возможность значительно повысить чувствительность регистрации небольших отклонений на каждом участке спектральной кри-

вой по отношению к соседнему с использованием большого усиления измеряемого сигнала.

Разность в оптической плотности для двух близких длин волн, отнесенная к величине спектрального интервала между ними, как функция длины волны  $\Delta D/\Delta\lambda = f(\lambda)$  в пределе при  $(\Delta\lambda \rightarrow 0)$  представляет собой *первую производную* спектра поглощения  $dD/d\lambda = f(\lambda)$ , что и отражено в названии метода. Значение производной прямо пропорционально крутизне наклона исходной кривой спектра поглощения, точки пересечения производной с осью длин волн (нулевой линией) соответствуют положению максимумов и минимумов

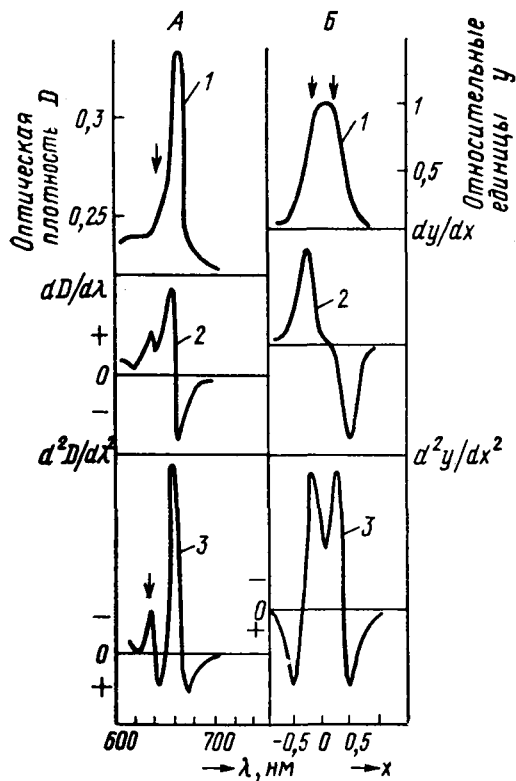


Рис. 3. Исходные спектры (1) и спектры первой (2) и второй (3) производных для смеси хлорофиллов *a* и *b* (взятых в соотношении 1:3) в ацетоне (А) и кривые, полученные с помощью ЭВМ, для симметричного дублета (гауссовы полосы с полушириной 0,3 отн. ед., амплитудой 1 отн. ед. и расстоянием между максимумами 0,25 отн. ед.) (Б)

в спектре поглощения, а относительные минимумы и максимумы на производной — точки перегиба кривой поглощения (рис. 3). На кривой первой производной более отчетливо проявляются элементы структуры спектра поглощения по сравнению с исходной кривой, а положение максимумов поглощения можно установить более точно.

Описываемый метод наряду с очевидными достоинствами имеет некоторые существенные недостатки и ограничения. Для некоторых частных случаев, например для симметричного дублета (две одинаковые гауссовы кривые), минимальное расстояние между полосами для их разрешения при использовании первой производной имеет ту же величину, что и для исходной суммарной кривой поглощения ( $\Delta\nu = 0,849 \Delta X$ ). Для более общего случая специальный анализ не был сделан, хотя эксперимен-



тальные данные указывают на преимущества измерения первой производной сложных спектров поглощения многокомпонентных систем. К недостаткам метода регистрации первой производной можно отнести и усложнение формы кривой. Первая производная принимает как положительные, так и отрицательные значения; отдельному максимуму поглощения соответствуют положительный и отрицательный максимумы на производной. Все эти обстоятельства делают целесообразным переход к измерению второй производной, который полностью аналогичен переходу от исходного спектра поглощения к первой производной.

*Вторая производная*  $d^2D/d\lambda^2 = f(\lambda)$ , как и все производные четных порядков, по общей форме значительно ближе к исходному спектру: максимуму поглощения соответствует максимум на второй производной, взятой с обратным знаком. Это позволяет легко сопоставлять кривые и быстро интерпретировать полученные результаты. Теоретический предел разрешения в этом случае заметно улучшается (рис. 3) за счет сужения полос в спектре второй производной. Так, полуширина полосы второй производной для гауссовой кривой составляет около половины полуширины исходной полосы. Вследствие этого минимальное расстояние между двумя разрешаемыми максимумами симметричного дублета исходного спектра уменьшается довольно заметно:  $\Delta\nu = 0,628 \Delta X$  для гауссовых кривых и  $0,325 \Delta X$  для лоренцевских. Для общего случая, когда спектр представляет собой суперпозицию более чем двух полос, отличающихся по интенсивности и полуширине, критерии разрешения пока не разработаны, однако сопоставление экспериментально зарегистрированных спектров поглощения и их производных для различных объектов исследования, а также результаты математического дифференцирования таких спектральных кривых убедительно свидетельствуют о преимуществах метода измерения второй производной.

Недостатком метода следует считать появление при двойном дифференцировании полосы так называемых *сателлитов* — дополнительных «провалов» (локальных минимумов) на обоих склонах основного максимума инвертированной второй производной. Дальнейший переход к четным производным более высоких порядков, применяемый иногда в ряде экспериментальных работ последних лет, сопровождается последовательным сужением полос и лучшим разрешением, однако при этом резко возрастает относительная величина сателлитов, увеличиваются требования к чувствительности и усложняется измерительная аппаратура. В связи с этим обычно измеряют лишь первую и вторую производную спектральных кривых.

В настоящее время предложены два основных способа получения производных спектров и два типа соответствующих установок. Первый способ называется *прямым методом получения производной*: измеряют непосредственно различия между двумя близкими монохроматическими лучами  $\lambda_1$  и  $\lambda_2$ , падающими на объект. Для этого

используют либо две близко расположенные выходные щели монохроматора, либо одну вибрирующую щель, периодически меняющую свое положение относительно проецируемого монохроматором спектра с амплитудой, соответствующей разнице  $\Delta\lambda$ . Поскольку при постоянной величине  $\Delta\lambda$  (в этом случае дисперсия в измеряемой области должна быть постоянной) производная  $\Delta D/\Delta\lambda$  пропорциональна разнице в оптической плотности для двух монохроматических лучей  $\lambda_1$  и  $\lambda_2$ , для получения спектральной кривой первой производной требуется зарегистрировать  $\Delta D$  во всей измеряемой области спектра поглощения ( $\Delta D = f(\lambda)$ ).

Задача не сводится только к измерению логарифма отношения интенсивностей пропущенных объектом лучей  $\lg(I_{\lambda_2}/I_{\lambda_1})$ , т. е. не совпадает с задачей измерения обычного спектра поглощения. Она значительно сложнее из-за повышенных требований к чувствительности и вследствие того, что измеряемые монохроматические лучи имеют различную длину волны. Поскольку  $\Delta D_{\lambda_2 - \lambda_1} = D_{\lambda_2} - D_{\lambda_1} = \lg(I_{0\lambda_2}/I_{\lambda_2}) - \lg(I_{0\lambda_1}/I_{\lambda_1}) = \lg(I_{0\lambda_2}/I_{0\lambda_1}) - \lg(I_{\lambda_2}/I_{\lambda_1})$ , измерения логарифма отношения интенсивности лучей, пропущенных объектом, еще недостаточно для регистрации  $\Delta D$  — величины, которая зависит также и от соотношения интенсивностей падающих лучей ( $I_{0\lambda_1}$  и  $I_{0\lambda_2}$ ). Это соотношение зависит от спектрального распределения энергии источника излучения и дисперсии монохроматора. Кроме того, при фотоэлектрическом способе измерения об интенсивности световых потоков  $I$  судят по величине фототока  $I_{\Phi} = KI$ . Однако коэффициент пропорциональности  $K$  зависит от спектральной чувствительности приемника света (фотоумножителя или фотоэлемента). Следовательно, необходимо вводить коррекцию, учитывающую спектральное распределение энергии на выходе монохроматора и спектральную чувствительность приемников излучения. Это приводит к значительному усложнению конструкции экспериментальной установки.

Второй способ получения производных спектров основан на измерении скорости изменения оптической плотности при непрерывной развертке спектра. Если величина электрического сигнала пропорциональна оптической плотности образца, а скорость развертки спектра постоянна ( $\Delta\lambda/\Delta t = \text{const}$ ), то скорость изменения сигнала будет пропорциональна первой производной:  $(\Delta D/\Delta t) \sim (\Delta D/\Delta\lambda) \cdot f(\lambda)$ . Для определения скорости изменения оптической плотности обычно используют принцип дифференцирования электрического сигнала. Преимущество этого способа заключается в относительной простоте, однако при этом необходимо обеспечить равномерность развертки спектра, точность дифференцирования сигнала и синхронизацию работы измерительной и регистрирующей частей применяемой схемы, так как дифференцирование фактически производится не по длине волны, а по времени.

При данном способе получения производной возникают те же трудности, что и при прямом методе измерения производной, кото-

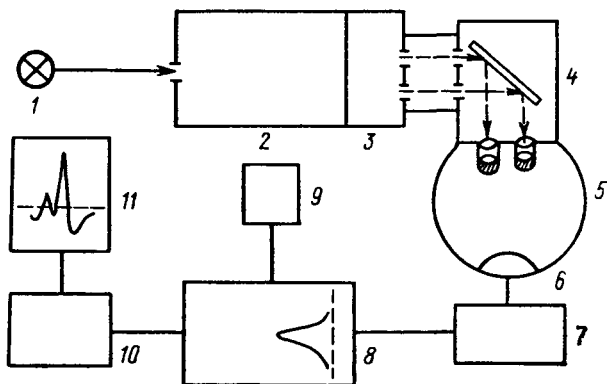


Рис. 4. Схема установки для измерения спектров поглощения и их производных при 293 и 77 К:

1 — источник света, 2 — двойной монохроматор, 3 — система модуляции и расщепления, 4 — кюветное отделение с призмой, 5 — интегрирующая сфера, 6 — фотоэлемент, 7 — усилитель фототока, 8 — система регистрации исходного сигнала, 9 — система питания дифференцирующей ячейки (10), 11 — система регистрации производных сигналов

рые связаны с повышением чувствительности, с учетом влияния спектральных характеристик установки и логарифмированием сигнала. Задача может быть облегчена, если использовать спектрофотометры, предназначенные для автоматической регистрации обычных спектров поглощения, например двухлучевые спектрофотометры.

Переход ко второй производной связан с дополнительными трудностями и наиболее просто может быть достигнут повторным дифференцированием электрического сигнала пропорционального первой производной. Включение дополнительного дифференцирующего звена не вызывает трудностей, однако уменьшение амплитуды сигнала должно быть компенсировано повышением чувствительности измерений. Кроме того, несколько усложняется и подбор оптимальных соотношений между чувствительностью и постоянной времени.

На рис. 4 приведена схема установки для измерения спектров поглощения и их производных. Эта установка, сконструированная на кафедре биофизики Биологического факультета МГУ, позволяет измерять первую и вторую производные спектров поглощения при 293 и 77 К во всей видимой области (400—750 нм). Основой прибора служит регистрирующий двухлучевой спектрофотометр СФ-14 с интегрирующей сферой. Запись производных спектров осуществляется автоматически с параллельной регистрацией исходного спектра поглощения. В установке предусмотрена возможность увеличения масштаба записи исходных спектров поглощения, что расширяет пределы измерения и позволяет регистрировать дифференциальные спектры при небольшой разнице в величинах оптической плотности образцов.

Для измерения спектров при низких температурах исследуемые объекты в специальных пластиковых кюветках помещают в сосуды Дьюара с жидким азотом, расположенные в интегрирующей сфере.

#### § 4. Методы поляризационной абсорбционной спектрофотометрии

Измерение поглощения биологических систем при освещении их поляризованным светом имеет очень большое значение для выяснения структурно-функциональных свойств объекта и его отдельных компонентов. Эти методы позволяют судить о взаимной ориентации поглощающих молекул, об их конформационных особенностях, о возможных путях миграции энергии возбуждения в биологических системах и целом ряде других важных свойств исследуемого объекта. Однако вследствие своей специфичности и сложности методы поляризационной спектрофотометрии пока еще недостаточно широко используются биологами. Для более глубокого понимания возможностей их применения следует рассмотреть те физические явления, которые лежат в основе этих методов.

Осциллирующий диполь излучает электромагнитную волну, характеризующуюся магнитным  $\mathbf{H}$  и электрическим  $\mathbf{E}$  векторами, которые взаимно перпендикулярны и, в свою очередь, перпендикулярны направлению распространения световой волны от диполя; скорость распространения волны  $v = c/n$  (где  $c$  — скорость света,  $n$  — показатель преломления среды). Оба вектора изменяются во времени синусоидально, а поток энергии в электромагнитной волне (или интенсивность света) пропорционален  $E^2$ .

*Обычный естественный свет* состоит из большого набора электромагнитных волн со всевозможными (случайными) направлениями колебаний векторов  $\mathbf{E}$  и  $\mathbf{H}$ . Однако если из естественного света каким-либо способом полностью или частично удастся отобрать составляющие с вполне определенной ориентацией, то он становится поляризованным. Устройства, предназначенные для получения поляризованного света, называются *поляризаторами*. Для получения поляризованного света используются разнообразные приемы: пропускание света через оптически анизотропные одноосные кристаллы; отражение и преломление света на границе двух диэлектриков; пропускание света через среду, оптическая анизотропия которой создается искусственно (например, либо воздействием магнитного или электрического поля, либо деформацией) и т. п.

Все эти методы связаны с *анизотропией диэлектрической проницаемости*  $\epsilon$ , и показателя преломления  $n$ , что приводит к зависимости фазовой скорости света ( $v = c/\sqrt{\epsilon}$ ) в среде от направления его распространения и от ориентации плоскости поляризации. *Плоскостью поляризации* считают плоскость, проведенную через вектор  $\mathbf{E}$  и луч-линию, касательная в каждой точке которой совпадает с направлением распространения волны в этой точке.

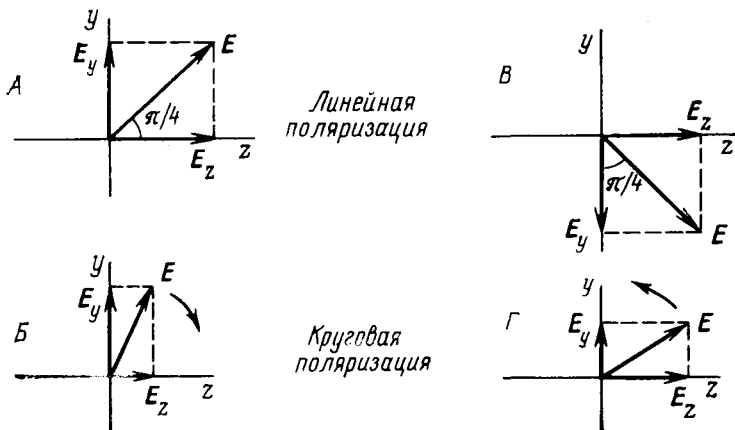


Рис. 5. Круговая поляризация света

Существуют понятия амплитуды  $A$  и интенсивности  $I$  электромагнитной волны. Если электромагнитная волна плоскополяризована, то  $I \approx A^2$ .

Для того чтобы понять, каким образом может возникнуть циркулярно поляризованный и эллиптически поляризованный свет, рассмотрим пучок плоскополяризованного света вдоль направления его распространения, когда ось  $x$  расположена перпендикулярно плоскости рисунка (рис. 5). Результирующий электрический вектор  $E$  можно охарактеризовать двумя взаимно перпендикулярными составляющими  $E_y$  и  $E_z$  (т. е. проекциями на оси  $y$  и  $z$ ). Тогда если компоненты электрического вектора  $E_y = E_0 \sin \omega t$  и  $E_z = E_0 \sin \omega t$  находятся в одинаковой фазе, то  $E$ , меняясь по синусоиде, остается в одной плоскости под углом  $\pi/4$  к каждой оси и распространяется вдоль оси  $x$ . Таким образом, в данном случае свет будет плоскополяризованным (рис. 5, А).

Если на пути света поместить поляризатор (например, кристалл, обладающий двулучепреломлением) с различными показателями преломления для компонентов  $E_y$  и  $E_z$  и если свойства поляризатора (например, толщина кристалла) таковы, что компонент  $E_y$  будет опережать  $E_z$  на  $\pi/2$  [ $E_y = E_0 \sin \omega t$ ;  $E_z = E_0 \sin \times (\omega t - \pi/2)$ ], то эта величина сдвига фаз приведет к следующему явлению. Компоненты  $E_y$  и  $E_z$  будут изменяться по синусоиде таким образом, что результирующий вектор  $E$  начнет вращаться по кругу вправо (по часовой стрелке), а его конец — описывать спираль вдоль направления оси распространения  $x$  и свет станет циркулярно поляризованным (поляризованным по кругу, рис. 5, Б; рис. 6).

Если угол опережения  $E_y$  относительно  $E_z$  составит  $\pi$ , то свет снова будет плоскополяризованным, но плоскость его поляриза-

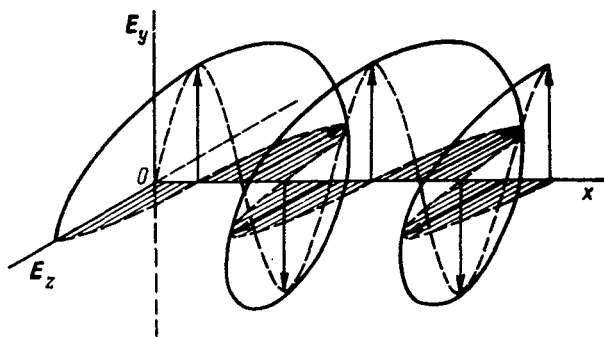


Рис. 6. Циркулярно поляризованная световая волна, распространяющаяся вдоль оси  $x$  (конец вектора описывает спираль)

ции окажется перпендикулярной плоскости поляризации света для случая, когда  $E_y$  и  $E_z$  находятся в одинаковой фазе (рис. 5, В). Когда, наоборот,  $E_z$  опережает по фазе  $E_y$  на  $\pi/2$ , т. е.  $E_z = E_0 \times \sin \omega t$ , а  $E_y = E_0 \sin (\omega t - \pi/2)$ , свет окажется *циркулярно поляризованным*, однако результирующий вектор  $E$  будет вращаться по кругу влево (против часовой стрелки), описывая своим концом спираль вдоль направления оси распространения световой волны (рис. 5, Г).

Опережение (запаздывание) одного из компонентов на любой другой угол, отличный от рассмотренных выше, будет приводить к *эллиптической поляризации света*, когда конец результирующего вектора  $E$  будет описывать эллипс.

Таким образом, в общем случае сдвиг по фазе между компонентами  $E_y$  и  $E_z$  приводит к возникновению эллиптической поляризации света с вращением конца вектора  $E$  по часовой стрелке или против нее по эллипсу и распространением волны вдоль оси  $x$ . Эллиптическая поляризация вырождается при сдвиге фаз компонентов на  $\pi/2$  в *круговую поляризацию*, а при совпадении по фазе или сдвиге на  $\pi$  — в *линейную поляризацию*.

Все методы поляризационной спектроскопии основаны на том принципе, что индивидуальные молекулы в зависимости от своего химического строения, а также более крупные молекулярные структуры (агрегаты, макромолекулярные комплексы, кристаллы и т. п.) могут по-разному поглощать свет, отличающийся характером своей поляризации. Так, молекулы с определенной химической структурой оказываются способными различным образом поглощать линейно поляризованный свет, который отличается ориентацией плоскости поляризации. Существуют также и так называемые *хиральные молекулы*, обладающие элементами спиральной структуры; эти молекулы преимущественно поглощают свет с правой или левой круговой поляризацией. Таким образом, использование методов поляризационной спектроскопии может дать информацию о структур-

ных особенностях и конформационных свойствах как индивидуальных молекул, так и более сложных макромолекулярных комплексов.

Хорошо известно, что различные электронные переходы в молекулах проявляются в виде полос поглощения, положение которых и интенсивность позволяют в ряде случаев получить информацию о химическом строении вещества и количестве поглощающих молекул.

Сила осциллятора, пропорциональная квадрату момента перехода:  $D_{ij} \sim |\mu_{ij}|^2$ , — является мерой интенсивности поглощения. Дипольный момент перехода ориентирован определенным образом относительно осей молекулы и является вектором  $\mu$ , который определяет направление и силу диполя.

Если плоскополяризованный свет падает на молекулы, которые определенным образом ориентированы по отношению к плоскости световых колебаний, то длина волны и коэффициент поглощения будут зависеть от этой ориентации.

Обычно коэффициент поглощения имеет значительную величину, только если колебания световой волны совершаются параллельно плоскости молекулы, и максимален, если такие колебания ориентированы параллельно длинной оси молекулы, поскольку затрагивают «наибольшее протяжение» электронной оболочки. В том случае, когда колебания световой волны становятся перпендикулярными по отношению к рассмотренным выше, т. е. происходят вдоль меньшего протяжения скелета молекулы, поглощается уже другая длина волны с другим коэффициентом поглощения. Такое явление, установленное ранее на кристаллах, называется *дихроизмом*.

Молекулы, содержащие систему сопряженных двойных связей эллиптического типа с делокализацией  $\pi$ -электронов, обладают двумя основными типами колебаний с взаимно перпендикулярными дипольными моментами, ориентированными соответственно вдоль длинной и короткой осей эллипса. Если вектор электрического поля  $E$  параллелен соответствующему дипольному моменту перехода  $\mu$ , то интенсивность данной полосы поглощения будет максимальна. В том случае, когда поглощающие молекулы не ориентированы (например, в растворе), усреднение поляризованного света позволяет оценить только усредненную в пространстве величину момента перехода. По этой причине для получения данных о внутримолекулярной ориентации  $\mu$  используют ориентированные образцы. Методы такой ориентации весьма разнообразны и определяются спецификой объекта. Образцы могут быть ориентированы в гидродинамическом потоке; при действии магнитных и электрических полей; в монослоях на поверхностях раздела фаз; при высушивании в растянутых пленках; при механической деформации полиакриламидного геля, содержащего объект, и т. п. При исследовании кристаллических образований используют их естественную молекулярную ориентацию.

## § 5. Метод линейного дихроизма

*Метод линейного дихроизма* — это измерение поглощения ориентированным объектом линейно поляризованного света, дающее возможность определить углы, которые различные моменты  $\mu_i$  образуют с одной или несколькими осями симметрии образца. В том случае, когда вектор  $E$  образует некоторый угол с вектором  $\mu$ , вероятность поглощения пропорциональна косинусу угла между ними ( $\cos \theta$ ). С учетом того, что интенсивность плоскополяризованной электромагнитной волны пропорциональна квадрату величины электрического вектора ( $I = E_{\text{max}}^2$ ), вероятность поглощения пропорциональна  $E^2 \mu^2 \cos \theta$ , где  $\mu^2 \cos \theta$  связан с молярным коэффициентом экстинкции. При исследовании линейного дихроизма  $LD$  ориентированный объект освещается измеряющим светом, поляризованным в двух взаимно перпендикулярных плоскостях. В одном случае плоскость поляризации выбирается параллельной, в другом — перпендикулярной оси ориентации образца.

Линейный дихроизм характеризуется величиной степени дихроизма  $P = (A_{\parallel} - A_{\perp}) / (A_{\parallel} + A_{\perp})$ , где  $A_{\parallel}$  и  $A_{\perp}$  соответствуют поглощению при поляризации измеряющего света параллельно и перпендикулярно направлению оси ориентации. Часто для характеристики поляризации поглощения используют величину линейного дихроизма ( $LD = \Delta A = A_{\parallel} - A_{\perp}$ ) или дихроичного отношения ( $D = A_{\parallel} / A_{\perp}$ ). Преимущество измерения дихроичного отношения в том, что эта величина не зависит от формы полосы поглощения.

Рассмотрим, как зависит поглощение ориентированного образца, обладающего осью симметрии, от взаимориентации дипольного момента перехода и электрического вектора падающего на объект плоскополяризованного света. Пусть вектор момента перехода  $\mu$  направлен под некоторым углом  $\theta$  к оси ориентации  $y$  и случайным образом ориентирован вокруг этой оси, а электрический вектор действующего на объект линейно поляризованного света направлен в одном случае параллельно, а в другом — перпендикулярно оси  $y$  (рис. 7, А).

В первом случае, когда вектор  $E$  параллелен оси ориентации,  $A_y = A_{\parallel} = 3A \cos^2 \theta$ , где  $A$  — поглощение для случайной ориентации (неориентированный образец). Во втором случае, когда  $E$  перпендикулярен оси  $y$  и лежит в плоскости  $zx$ ,  $A_{zx} = A_{\perp} = (3/2) A \sin^2 \theta$ . Если измеряющий свет поляризован в плоскости, параллельной плоскости  $zx$ , то  $A_{\parallel} = (3/2) A \sin^2 \theta$ . Когда свет поляризован перпендикулярно плоскости  $zx$ ,  $A_{\perp} = 3A \cos^2 \theta$ . В этом случае  $LD = 3A [(1/2) \sin^2 \theta - \cos^2 \theta] = 3A [(1 - 3 \cos^2 \theta) / 2]$ ;  $D = \text{tg}^2 \theta / 2$ . Угол  $\theta$  может принимать любое значение от 0 до  $\pi/2$ ;  $D$  определяет параметры так называемого «усредненного перехода», ориентированного таким образом, что поляризация его поглощения совпадает с регистрируемой в эксперименте поляризацией поглощения всего образца.



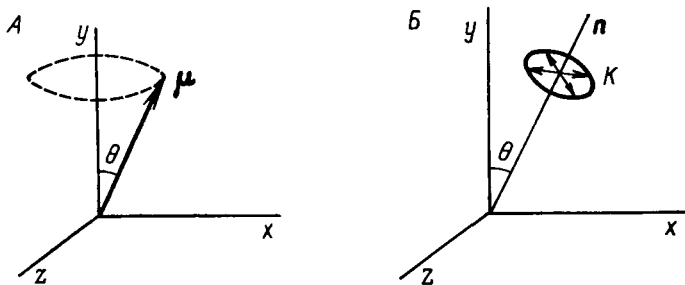


Рис. 7. Линейный дихроизм для образца с осевой (А) и плоскостной (Б) симметрией

При хаотической ориентации электронных переходов  $D = 1$  ( $D_{\parallel} = D_{\perp}$  и  $\theta = \arctg(\pm\sqrt{2}) \approx 54^{\circ} 40'$ ). Если угол  $\theta > 54^{\circ} 40'$ , то  $D > 1$ ; при  $\theta < 54^{\circ} 40'$   $D < 1$ . При идеальной ориентации, когда все электронные переходы ориентированы строго параллельно плоскости  $zx$  ( $\theta = \pi/2$ ), дихроичное отношение бесконечно. Если все электронные переходы ориентированы перпендикулярно ( $\theta = 0$ ), то  $D = 0$ .

Величина  $q = (1 - 3 \cos^2 \theta)/2$  называется *параметром порядка* и часто используется для описания степени упорядоченности образца. Если  $\pi/2 \geq \theta > 54^{\circ} 40'$ , то  $1/2 \geq q > 0$ ; при  $\theta < 54^{\circ} 40'$ , величина  $q$  становится отрицательной. Параметр порядка связан с величиной линейного дихроизма и дихроичного отношения следующими соотношениями:  $LD = 3Aq$ ;  $D = (1 + q)/(1 - q)$ . Существуют молекулы, имеющие плоскостную симметрию. В этом случае векторы моментов  $\mu$  в такой плоскости  $K$  раскладываются на пару одинаковых взаимно перпендикулярных моментов, обладающих равной частотой и дающих одну полосу поглощения (так называемое *плоскостное вырождение* момента перехода). Когда при этом наблюдается также ориентация с осевой симметрией, можно оценить угол  $\theta$  между осью  $y$  и нормалью  $n$  к плоскости вырождения  $K$ . Из соотношений  $A_{\parallel} = A_y = (3/2) A \sin^2 \theta$  и  $A_{\perp} = A_{zx} = 3A(1 + \cos^2 \theta)/4$  получим, что  $D = 2 \sin^2 \theta / (1 + \cos^2 \theta)$  (рис. 7, Б).

На ряде объектов (например, на фрагментах фотосинтетических мембран) осевая ориентация может быть получена при их высушивании на плоской поверхности. В соответствии с вышеприведенными рисунками эта поверхность является плоскостью  $zx$  и в этом случае экспериментальное определение величины  $A_y$  оказывается невозможным, так как при параллельной ориентации Е оси  $y$  измеряющий свет должен проходить через боковую поверхность исследуемого образца (в ребро). Однако оказывается возможным определить величину  $A_{zx}$  (свет распространяется вдоль оси  $y$ , а электрический вектор расположен в плоскости  $zx$ ) и величину  $A_B$  (свет распростра-

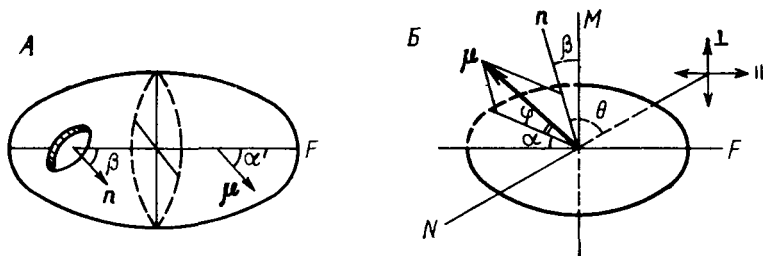


Рис. 8. Модели ориентации (А, Б) макромолекулярных комплексов, возникающей при деформации полиакриламидного геля

няется внутри образца под некоторым углом  $\beta$  к оси  $z$ , вектор  $E$  составляет угол с плоскостью  $zx$ , используя соотношения

$$A_{\beta} = A_y \cos^2 \beta + A_{zx} \sin^2 \beta; \quad A_{\beta}/A_{zx} = (A_y/A_{zx}) \cos^2 \beta + \sin^2 \beta.$$

Как было отмечено выше, одним из способов ориентации объектов является *ориентация в полиакриламидном геле*. Разработанный впервые в нашей стране (И. А. Абдурахманов, Ю. Е. Ерохин), этот метод основан на том, что исследуемые образцы заключаются в норы геля и при его механической деформации происходит преимущественная ориентация объекта. Метод ориентации в полиакриламидном геле с большим успехом применяется для таких объектов, как мембранные везикулы и макромолекулярные комплексы. В качестве меры деформации при ориентации образцов берется величина  $N = l/l_0$ , где  $l_0$  и  $l$  — начальная и конечная длина геля. При механической деформации геля мембранные везикулы изменяют свою форму. Так, сферические хроматофоры фотосинтезирующих бактерий принимают форму эллипсоида вращения и поверхности мембран преимущественно ориентируются вдоль оси растяжения. Степень дихроизма  $P$  пигментов с учетом угла  $\alpha$  между моментом перехода и нормалью к плоскости мембраны рассчитывают следующим образом:

$$P = \frac{(3x-1)(3 \cos^2 \alpha - 1)}{3-x + (3x-1) \cos^2 \alpha},$$

$$\text{где } x = \frac{1}{N^3-1} \frac{[N^3/(N^3-1)] \operatorname{arctg}(1/\sqrt{N^3-1}) - 1}{[N^3/(N^3-1)] \operatorname{arctg}(1/\sqrt{N^3-1}) + 1}.$$

В случае ориентации в полиакриламидном геле макромолекулярных комплексов и, в частности, пигмент-белковых комплексов фотосинтезирующих организмов можно также определить величину степени дихроизма пигментов. Такие комплексы хорошо аппроксимируются достаточно жесткими частицами, имеющими форму трехосного эллипсоида вращения (рис. 8, А). При одноосной деформации геля вследствие механического сдвига длинные оси  $F$  эллипсоидов обычно ориентируются в направлении растяжения пор геля.

Обозначив через  $\alpha'$  угол между длинной осью  $F$  и моментом перехода  $\mu$ , можно показать, что

$$P = \frac{(3y-1)(3\cos^2\alpha' - 1)}{3-y+(3y-1)\cos^2\alpha'}, \text{ где}$$

$$y = \frac{N^3}{N^3-1} \left( 1 - \frac{1}{\sqrt{N^3-1}} \arctg \sqrt{N^3-1} \right).$$

Если момент перехода описывается ротатором (как, например, для гемов цитохромов), то можно определить ориентацию плоскости ротатора. Степень дихроизма вычисляют в этом случае по формуле

$$P = \frac{(3y-1)(3\sin^2\beta - 2)}{2(3-y) + (3y-1)\sin^2\beta},$$

где  $\beta$  — угол между длинной осью макромолекулы и нормалью к плоскости ротатора.

Согласно другой модели ориентации в полиакриламидном геле, пигмент-белковые комплексы рассматриваются в виде эллипсоидов вращения дискообразной формы. Результаты расчетов, так же как и в описанных выше случаях, хорошо согласуются с экспериментальными данными. Предлагаемая модель ориентации проиллюстрирована на рис. 8, Б. Дипольный момент перехода пигмента в комплексе  $\mu$  образует угол  $\varphi$  с плоскостью диска, его проекция на эту плоскость — угол  $\alpha$  с направлением сдвига  $F$  (направлением вытягивания геля), а нормаль к этой плоскости  $n$  образует угол  $\beta$  с направлением  $M$  и угол  $\theta$  с направлением  $N$ . В идеальном случае, когда система полностью упорядочена (т. е. направление  $F$  проходит через плоскость диска), угол  $\theta = \pi/2$ . При регистрации в направлении  $N$  поглощение света, поляризованного параллельно и перпендикулярно направлению сдвига  $F$ , определяется выражениями  $A_{\parallel} = (\mu F)^2$ ;  $A_{\perp} = (\mu M)^2$ , где  $(\mu F)^2$  и  $(\mu M)^2$  — квадраты проекции вектора  $\mu$  на оси  $F$  и  $M$  соответственно, а  $F$  и  $M$  — единичные векторы вдоль лабораторных координат. После усреднения по углам  $\alpha$  и  $\beta$  и вычисления

$$A_{\parallel} = (\mu^2/2) \cos^2\varphi; \quad A_{\perp} = (\mu^2/2) (1 - \cos^2\varphi/2).$$

Дихроичное отношение  $D = A_{\parallel}/A_{\perp}$  для такой системы изменяется от 0 при  $\varphi = \pi/2$  до 2 при  $\varphi = 0$ . Если  $\varphi \approx 35^\circ$ , то  $D = 1$ , т.е.  $A_{\parallel} = A_{\perp}$ , и переходы, моменты которых составляют угол  $\varphi > 35^\circ$ , будут преимущественно поглощать перпендикулярно поляризованный свет ( $D < 1$ ), тогда как при  $\varphi < 35^\circ$   $D > 1$ .

Поскольку величины линейного дихроизма ( $\Delta A$ ) и поглощения ( $A$ ) легко измеримы, для вычисления угла  $\varphi$  можно использовать соотношение

$$\Delta A/A = (A_{\parallel} - A_{\perp})/A = [(1 - 3\sin^2\varphi)/4] f(\theta),$$

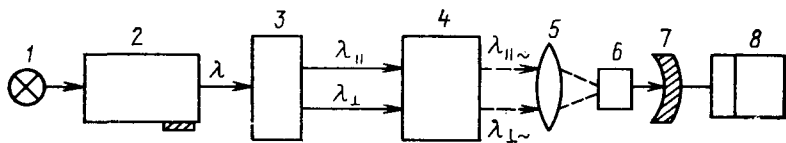


Рис. 9. Схема установки для измерения линейного дихроизма:

1 — источник света, 2 — монохроматор, 3 — система расщепления светового луча на два взаимно перпендикулярных линейно поляризованных компонента, 4 — система модуляции, 5 — фокусирующая система, 6 — ориентированный образец, 7 — приемник света, 8 — система усиления и регистрации фототока

где  $f(\theta)$  — фактор порядка системы, который, являясь функцией угла  $\theta$ , изменяется от 1 (при идеальной упорядоченности) до 0 (для неориентированных образцов) и не зависит от угла  $\varphi$ .

Целый ряд экспериментальных измерений и расчетов связан с регистрацией спектральных зависимостей поляризационных параметров. Зависимости  $\Delta A = A_{\parallel} - A_{\perp} = f(\lambda)$ ;  $D = A_{\parallel}/A_{\perp} = f(\lambda)$ ;  $P = (A_{\parallel} - A_{\perp})/(A_{\parallel} + A_{\perp}) = f(\lambda)$  представляют собой спектры линейного дихроизма, дихроичного отношения, степени дихроизма соответственно.

Разлагая на компоненты спектры поглощения  $A = f(\lambda)$  и величины линейного дихроизма и используя соотношение  $(A_{\parallel} - A_{\perp})/A$ , можно вычислить углы, отражающие взаимориентацию соответствующих моментов переходов различных компонентов, которые обуславливают наличие определенных полос, составляющих суммарный спектр поглощения исследуемой системы.

Для регистрации спектров  $LD$  обычно применяют двухлучевые дифференциальные спектрофотометры, у которых лучи, падающие на объект, линейно поляризованы в двух взаимно перпендикулярных плоскостях. Таким образом, измерение спектров линейного дихроизма  $A_{\parallel} - A_{\perp} = \Delta A = f(\lambda)$  в принципе аналогично измерению разностных спектров поглощения при непосредственной регистрации  $\Delta D = f(\lambda)$ .

Принципиальная схема установки для измерения спектров  $LD$  ориентированных образцов показана на рис. 9.

Монохроматическое излучение, полученное после прохождения света через оптическую систему спектрофотометра, направляется поворотным зеркалом на линзу и затем на призму Рошона, с помощью которой выделяется линейно поляризованная составляющая светового потока. Далее свет проходит через призму Волластона, расщепляясь на два равных по интенсивности компонента, но поляризованные во взаимно перпендикулярных плоскостях. При этом лучи света с разной поляризацией разделяются пространственно и модулируются прерывателем с определенной частотой, а затем фокусируются линзой на кювету с образцом. Таким образом, через образец попеременно пропускается свет, поляризованный в горизонтальной и вертикальной плоскостях. Прошедший через образец свет направляется на фотоприемник, затем сигнал усиливается и регистрируется с помощью специальной электрической системы. Для измерения спектров  $LD$  при низких тем-

температурах кювету с образцом помещают в криостат, заполненный жидким азотом.

Существуют и другие схемы дихрографов, основанных на таком же общем принципе регистрации. Кюветные отделения могут существенно различаться в зависимости от способа ориентации образца. Например, при ориентации образцов в магнитном поле разработано специальное устройство, позволяющее вводить в кюветное отделение постоянный магнит и создавать в кюветном отделении необходимую напряженность поля. Использование образцов, ориентированных в полиакриламидном геле, не создает никаких дополнительных трудностей и не требует специальной переделки кюветной камеры.

### § 6. Методы кругового дихроизма и дисперсии оптического вращения

Хорошо известно, что практически все синтезируемые биологическими системами молекулы оптически активны. Необходимо понимать, каким образом оптически активная среда изменяет характер поляризации действующего на нее света и какие параметры при этом измеряются экспериментатором для получения информации о свойствах исследуемого объекта.

При прохождении света через оптически активную среду можно проводить исследование *кругового дихроизма* (КД), эллиптичности  $\Theta$ , оптического вращения  $\Phi$  и кругового двулучепреломления (КДП). Все эти оптические характеристики взаимосвязаны и дают информацию о структуре и конформационных свойствах как отдельных молекул, так и макромолекулярных комплексов.

Для того чтобы понять, что представляют собой перечисленные выше характеристики, необходимо рассмотреть, каким образом изменяются свойства плоскополяризованного света, когда он проходит через оптически активную среду. Если представить плоскополяризованную волну в виде векторной суммы двух циркулярно поляризованных компонентов с одинаковой амплитудой, но различающихся противоположной круговой поляризацией, то одна составляющая будет поляризована по кругу вправо ( $R$ ), а другая — влево ( $L$ ). Таким образом, для этих волн конец электрического вектора при их распространении вдоль направления  $z$  описывает спираль соответственно с левым или правым вращением, а его проекция на плоскость  $xy$  (перпендикулярную направлению распространения света) является кругом (рис. 10).

Если обозначить через  $E_x$  и  $E_y$  компоненты электрического вектора  $E$ , то для волны с правой круговой поляризацией

$$E_x = E_0 \cos(\omega t - Kz); \quad E_y = -E_0 \sin(\omega t - Kz),$$

а для волны с левой круговой поляризацией

$$E_x = E_0 \cos(\omega t - Kz); \quad E_y = E_0 \sin(\omega t - Kz),$$

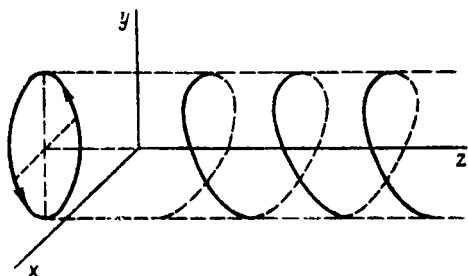


Рис. 10. Мгновенное изображение поляризованной по кругу световой волны

Для наблюдателя, который смотрит навстречу распространяющейся вдоль оси  $z$  волне, конец электрического вектора вращается против часовой стрелки (левая поляризация)

(КД), а также распространяться с разными скоростями (КДП). Таким образом, оптическая среда, имеющая круговое (или циркулярное) двулучепреломление, одновременно обладает и круговым (или циркулярным) дихроизмом. Если поглощение света для компонентов с правой ( $A_R$ ) и левой ( $A_L$ ) круговой поляризации различается, то после прохождения через оптически активную среду результирующий электрический вектор  $E$  уже не будет лежать в одной плоскости, а станет описывать эллипс. Это происходит потому, что правая и левая составляющие, хотя и сохраняют свою круговую поляризацию, будут иметь различные амплитуды. При их сложении конец электрического вектора будет двигаться по эллиптической винтовой линии вдоль оси распространения, а его проекция на плоскость, перпендикулярную этой оси, будет представлять собой эллипс (рис. 11). Следовательно, эллиптичность  $\Theta$  является одной из характеристик оптической активности; она определяется как  $\arctg(a/b)$ , где  $a$  — малая,  $b$  — большая оси эллипса. Если поглощение света средой очень мало, то соотношение осей эллипса близко к нулю ( $\Theta \approx 0$ ) и свет можно считать плоскополяризованным (на рис. 11  $\Theta = \varphi$ ).

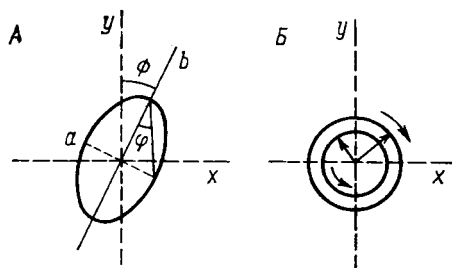


Рис. 11. Эллиптически поляризованный свет. А — свет выходит из образца (направление распространения перпендикулярно плоскости рисунка); Б — левая и правая составляющие плоскополяризованного света, выходящего из образца (при их векторном сложении проекция на плоскость  $xy$  даст эллипс)

где  $\omega = 2\pi\nu$ ;  $K = \omega/c$ . Отсюда очевидно, что при суммировании этих двух волн получается плоскополяризованная волна:

$$E_x = 2E_0 \cos(\omega t - Kz);$$

$$E_y = 0.$$

В том случае, когда такие два поляризованных по кругу компонента («правая» и «левая» волна) проходят через оптически активную среду, они могут по-разному поглощаться

приводит к *эллиптичности*. Ориентация эллипса (направление его большой оси) будет определяться разной скоростью распространения в среде этих двух составляющих (левой и правой), т. е. *круговым двулучепреломлением*. Так как оптически активная среда будет иметь для таких составляющих разные показатели преломления ( $n_L$  и  $n_R$ ), то это приведет к фазовому сдвигу между компонентами (пропорциональному  $\Delta n = n_L - n_R$ ) и при их сложении — к повороту большой оси эллипса (рис. 11). Отсюда следует, что большая ось эллипса окажется не параллельной направлению поляризации падающего на объект линейно поляризованного света и будет повернута относительно оси  $y$  на угол  $\Phi$ , т. е. возникает *оптическое вращение* (ОВ). Если среда практически не поглощает свет, то, оставаясь плоскополяризованным, он просто изменит свою ориентацию — произойдет поворот плоскости поляризации.

Оптическое вращение  $\Phi$  и эллиптичность  $\Theta$  обычно выражаются в градусах в соответствии с соотношениями

$$\Phi = (180l/\lambda)(n_L - n_R); \quad \Theta = 2,303(A_L - A_R) [180/(4\pi)],$$

где  $l$  — толщина образца,  $\lambda$  — длина волны падающего света.

Величина кругового двулучепреломления ( $n_L - n_R$ ), как правило, невелика, и поэтому непосредственно измеряют  $\Phi$ . В случае кругового дихроизма обычно измеряют величину  $\Delta A = A_L - A_R$ , поскольку она превышает величину эллиптичности.  $\Theta$  можно рассчитать, воспользовавшись вышеприведенным соотношением.

Величина молярного вращения или эллиптичности определяется из соотношений

$$[\Phi]_M = 100\Phi/(cl); \quad [\Theta]_M = 100\Theta/(cl),$$

где  $c$  — концентрация в молях на литр,  $l$  — длина оптического пути. Для полимерных молекул (например, полипептидов или белков) вычисляют оптическую активность на 1 моль мономерных звеньев или аминокислотных остатков.

При измерении КД результаты в ряде случаев представляют как разницу молярных коэффициентов экстинкции ( $\epsilon$ ) для составляющих с левой и правой круговой поляризацией, используя уравнение  $[\Theta]_M = 3300(\epsilon_L - \epsilon_R)$ .

Величина КД, которая определяется разницей в поглощении ( $A_L - A_R$ ) и ОВ, возникающего из-за различий показателей преломления ( $n_L - n_R$ ), будут зависеть от частоты (или длины волны). Можно ожидать, что функции  $\Theta(\lambda)$  и  $\Phi(\lambda)$  будут походить на зависимость от длины волны обычного поглощения  $A$  и показателя преломления  $n$ .

Зависимость ОВ от частоты носит название *дисперсии оптического вращения* (ДОВ). В области полосы поглощения (в области КД) ДОВ становится аномальной, имея нулевое значение в максимуме поглощения (совпадает с максимумом или минимумом спектра КД). В области спектра вне полосы поглощения ДОВ называется

нормальной и обычно изменяется плавно (спадает медленно), подчиняясь уравнению Друде

$$\Phi(\lambda) = R_i \lambda_i^2 / (\lambda^2 - \lambda_i^2),$$

где  $R_i \lambda_i^2$  — постоянная, которая характеризует интенсивность полосы в спектре КД,  $\lambda_i$  — длина волны в максимуме полосы, соответствующая нулевому значению ДОВ,  $R_i$  — сила вращения  $i$ -перехода (мера интенсивности поглощения).

В случае системы с несколькими собственными частотами (максимумами поглощения)

$$\Phi(\lambda) = \sum_i R_i \lambda_i^2 / (\lambda^2 - \lambda_i^2).$$

Сила вращения полосы в спектре КД определяется площадью этой полосы с учетом ее знака и связана с  $\Theta(\lambda)$  следующим образом:

$$R_i = \frac{3hc}{8\pi^3 N_A} \int \frac{\Theta(\lambda)}{\lambda} d\lambda,$$

где  $N_A$  — число Авогадро,  $h$  — постоянная Планка,  $c$  — скорость света. При наличии нескольких полос поглощения имеет место соотношение  $\sum_i R_i = 0$ , которое называется *правилом сумм*.

Приведенные выше соотношения показывают, что КД проявляется только в области полос поглощения (*эффект Коттона*), а оптическое вращение наблюдается и в той области, где поглощение света практически отсутствует. Это легко объясняет тот факт, что ряд веществ имеет оптическое вращение в той области, где они не поглощают свет. Так, сахароза обладает ОВ в видимой области спектра.

Известно, что каждой полосе поглощения можно поставить в соответствие линейный осциллятор. Он не обладает способностью вращать плоскость поляризации света. Однако если осцилляторы взаимодействуют между собой, что возникает, например, при сближении хромофоров, то в таких системах может возникнуть оптическая активность. Если осцилляторы до их сближения имели одинаковые частоты, то при возникновении взаимодействия между ними полоса поглощения  $\nu_0$ , соответствующая изолированным осцилляторам (невзаимодействующим мономерам), расщепится. Для системы, состоящей из двух связанных осцилляторов (для димера), частота  $\nu_0$  расщепится на две с частотами  $\nu_1$  и  $\nu_2$ .

Такая модель была предложена Куном и состояла из двух взаимодействующих осцилляторов, расположенных в разных плоскостях и ориентированных под углом  $\varphi$  по отношению друг к другу. Когда два мономера не взаимодействуют (димер состоит из невзаимодействующих мономеров), то при измерении поглощения с частотой  $\nu_0$  ( $E^* - E_0$ )/ $h$ , (где  $E^*$  и  $E_0$  — энергии возбужденного и основного энергетических уровней мономера) невозможно выявить, какой из мономеров переходит в возбужденное состояние. Од-



нако при наличии взаимодействия между мономерами возмущение будет расщеплять возбужденное состояние такого димера и величина расщепления составит  $2\Delta\nu$ . В этом случае частоты полос поглощения димера будут равны  $\nu_1 = \nu_0 + \Delta\nu$  и  $\nu_2 = \nu_0 - \Delta\nu$  соответственно. Величина расщепления  $2\Delta\nu$  является функцией расстояния между мономерами  $R$  и угла  $\varphi$  между моментами переходов, которые соответствуют поглощению этих мономеров (т.е. зависит от их ориентации). Интенсивность полос поглощения димера  $D_1$  и  $D_2$  зависит только от угла между моментами переходов мономеров, поскольку  $D_1 = D_0 + D_0 \cos \varphi$ ;  $D_2 = D_0 - D_0 \cos \varphi$ , где  $D_0$  — дипольная сила мономера. При этом полная интегральная интенсивность поглощения димера равна удвоенной интенсивности мономера и не зависит от его геометрии:  $D_1 + D_2 = 2D_0$ .

При прохождении линейно поляризованного света с частотой  $\nu$  через слой вещества единичной толщины с концентрацией димеров  $d$  плоскость его поляризации повернется на угол  $\Phi$  (произойдет оптическое вращение):

$$\Phi = \pi d f_0 \frac{e^2 \nu^2}{mc^2} \left( \frac{1}{\nu_1^2 - \nu} - \frac{1}{\nu_2^2 - \nu} \right) R \sin \varphi,$$

где  $e$  и  $m$  — заряд и масса электрона,  $c$  — скорость света,  $f_0$  — сила осциллятора,  $R$  — расстояние между мономерами,  $\varphi$  — угол между моментами переходов мономеров,  $\nu_1$  и  $\nu_2$  — частоты полос поглощения димера. Уравнение показывает, что  $\Phi = 0$ , если  $R$  или  $\varphi$  равны нулю, и что при отсутствии взаимодействия ( $\nu_1 = \nu_2 = \nu_0$ ) между осцилляторами оптическое вращение отсутствует. Система, имеющая плоскость или центр симметрии, оптически не активна.

В спектре КД димера, образованного двумя взаимодействующими молекулами мономера, проявятся две полосы, которые будут соответствовать экситонным полосам поглощения с частотами  $\nu_1$  и  $\nu_2$ . Вклад в эти полосы поглощения в соответствии с теорией будут вносить три компонента, отражающие соответственно суммарный КД двух изолированных мономеров и возмущение мономеров электрическим полем димера, магнитоэлектрическое взаимодействие и экситонное взаимодействие. В большинстве случаев КД димера будет определяться именно третьим компонентом, т. е. *экситонным взаимодействием*, и зависеть от расстояния между мономерами и их взаимной ориентации. В том случае, если значение силы вращения определяется экситонным взаимодействием, интенсивность обеих полос поглощения в спектре КД димера будет одинакова, однако полосы будут иметь противоположную направленность («+» и «—» соответственно). Такой спектр называется *консервативным*, поскольку суммарная сила вращения будет равна нулю ( $R_1 + R_2 = 0$ ).

В том случае, если величина расщепления  $2\Delta\nu$  невелика, измеряемый КД окажется гораздо меньшим по сравнению с интенсивностью каждой из полос в отдельности вследствие суммации двух про-

тивополюжно направленных компонентов. С другой стороны, спектр КД имеет значительное преимущество перед обычным спектром поглощения благодаря существованию полос противоположного знака, которые значительно легче обнаружить по КД, в особенности при небольшой величине экситонного расщепления. Так как экситонный член в уравнении для определения силы вращения переходов в димере будет представлять собой смешанное произведение трех векторов (моментов перехода для обоих мономеров и расстояния между центрами мономеров), то для некоторых конформаций димера КД исчезает. Так, если хромофоры в димере параллельны, компланарны или взаимно перпендикулярны, спектра КД не будет (в первых двух случаях расщепление есть, а сигнала КД — нет, в последнем — отсутствует расщепление и суммарный КД равен нулю).

Таким образом, метод КД оказывается весьма чувствительным к конформации молекул, включающих совокупность хромофоров. В том случае, если мономеры обладают относительно малым КД, обычно исследуют разностные спектры КД ( $\Delta\theta = [\theta]$  димера —  $[\theta]$  мономера). Расчет КД различного ряда олигомеров биологического происхождения, как правило, производят таким же образом, как и для димеров. Конформационный анализ значительно упрощается, если спектр КД в основном определяется экситонным членом. В этом случае дипольные силы для различных полос можно определить из спектра поглощения, направления дипольных моментов — из спектров линейного дихроизма и необходимо вычислить лишь величину расщепления. Однако, поскольку мономер часто может иметь несколько полос поглощения, вычисление магнитоэлектрического и экситонного членов сильно затрудняется из-за необходимости учитывать взаимосвязь между полосой одного мономера и набором полос всех других мономеров.

Тем не менее для целого ряда биологически важных полипептидов ситуация упрощается, например из-за малого влияния боковых групп молекулы на ее оптические свойства (как в случае поли-L-аланина), и тогда в ближнем ультрафиолете учитываются лишь  $\pi \rightarrow \pi^*$ - и  $n \rightarrow \pi^*$ -переходы в полипептиде. Оказалось, что в этих случаях расчетный спектр КД хорошо совпадает с экспериментальным (например, для поли-L-аланина).

Методы ДОВ и КД широко применяют для изучения конформации белков, нуклеиновых кислот, при исследовании взаимодействия белков с малыми молекулами, при анализе образования крупных комплексов из субъединиц, при изучении структуры пигмент-белковых комплексов и т.п.

Спектры КД очень чувствительны к локальным взаимодействиям, и даже в том случае, если не удастся дать полное структурное описание, изменения в структуре обычно проявляются при регистрации кругового дихроизма. Спектры КД часто применяют при изучении связывания биополимеров с малыми молекулами. При этом

малые молекулы сами по себе могут быть и оптически неактивными, однако при связывании с полимером из-за электронных взаимодействий с центром связывания или вследствие конформационных изменений величина полос в индуцированном спектре КД будет фактически отражать свойства биополимера. Наиболее удобными в этом случае будут такие молекулы, которые способны поглощать видимый свет. В индуцированный КД будут вносить вклад как одноэлектронные члены (отражающие влияние окружения), так и экситонные члены (отражающие взаимодействие между компонентами). Например, в гемоглобине оптическая активность групп гема в основном будет определяться взаимодействием с соседними остатками белковой молекулы.

Спектры КД и ДОВ широко используют для определения количества спиральных структур в макромолекулах. Асимметричная природа  $\alpha$ -углеродного атома полипептидов и белков частично связана с поглощающими в видимой и ультрафиолетовой областях близко расположенными амидными группами. Это, в свою очередь, приводит к появлению КД и ДОВ, которые могут значительно увеличиваться из-за влияния вторичной структуры белка (наличия оптически активных  $\alpha$ -спиралей или  $\beta$ -структур). Поскольку полосы в спектре КД лучше разрешены, чем в спектрах ДОВ, первый метод с успехом используют для количественного определения содержания вторичных структур ( $\alpha$ -спиралей,  $\beta$ -структур, конформации беспорядочного клубка). Однако ДОВ, распространяясь на более широкий диапазон частот, дает информацию о тех областях спектра, которые лежат вне полос поглощения и часто за пределами спектрального интервала, регистрируемого на обычно используемых приборах (например, расположены в ультрафиолетовой части спектра).

Определение относительной доли вторичных структур белков производят при измерении КД в диапазоне от 190 до 230 нм. Белковую молекулу при этом рассматривают как линейную комбинацию конформационных участков в состояниях  $\alpha$ -спирали,  $\beta$ -слоев и беспорядочного клубка, а спектры КД сравнивают со спектрами гомополнпептидов известной конформации. Такое приближение оказывается возможным, поскольку экспериментальные данные показали, что спектр КД в исследуемом диапазоне мало зависит от природы алифатических боковых групп, а в основном определяется полипептидным остовом.

В последнее время находит применение метод *магнитного кругового дихроизма* (МКД). Этот метод основан на индуцировании оптической активности (в том числе и у «нехиральных» молекул) наложением статического сильного магнитного поля. При этом у оптически неактивных молекул появляется как КД, так и ДОВ, а у «хиральных» молекул наряду с полосами в естественном КД обнаруживаются индуцированные магнитным полем новые полосы. Теория метода МКД достаточно сложна, и существует лишь несколько приме-

ров, когда МКД использовали для выяснения структурно-функциональных свойств макромолекул. На возможности этого метода указывают, например, такие факты, как различие спектров МКД для триптофана и тирозина при достаточно близких для этих веществ спектрах поглощения.

При измерении спектров КД в настоящее время используют современные спектрополяриметры с двойным монохроматором для уменьшения влияния рассеянного света, с кварцевыми призмами для выделения монохроматического светового потока, которые одновременно служат поляроидами, и пьезомодулятором переменного напряжения для преобразования линейно поляризованного света в эллиптически поляризованный с определенной частотой модуляции.

На рис. 12 приведена принципиальная схема спектрополяриметра (типа Jasco), который используют для измерения КД различных биополимеров.

Луч света от источника (ксеноновая лампа) фокусируется сферическим зеркалом 3 на входную щель 4. Часть оптической системы от входной щели 4 до промежуточной щели 8 представляет собой первый монохроматор, другая часть оптической системы от 8 до выходной щели 13 — второй монохроматор. Первый и второй монохроматоры идентичны и совместно образуют двойной монохроматор, что необходимо для уменьшения рассеянного света, который может приводить к различным артефактам при измерении вращения плоскости поляризации в области сильного поглощения света в оптически активном веществе. С помощью системы сферических зеркал луч света попадает на кристаллические призмы 6 и 10, отличающиеся направлением осей. Проходя призмы монохроматоров, луч света становится монохроматичным и одновременно линейно поляризованным в горизонтальной плоскости.

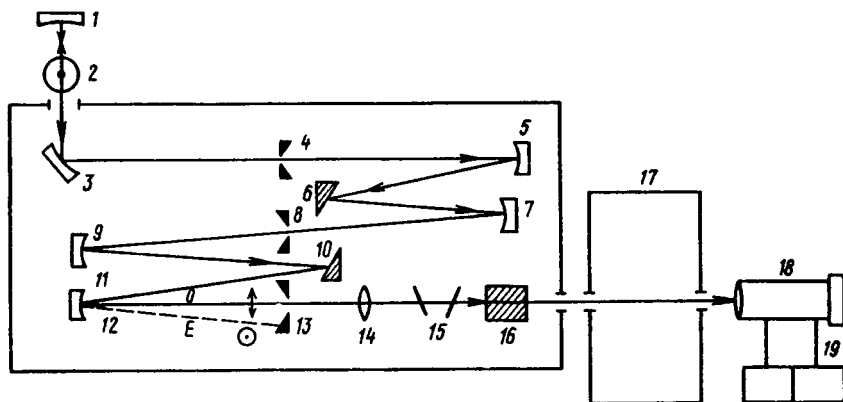


Рис. 12. Схема спектрополяриметра для измерения КД:

1, 3, 5, 7, 9, 11 — сферическое зеркало, 2 — источник света, 4 — входная щель, 6 — первая призма (с горизонтальной осью), 8 — промежуточная щель, 10 — вторая призма (с вертикальной осью), 12 — обыкновенный (O) и необыкновенный (E) лучи, 13 — входная щель, 14 — фокусирующая линза, 15 — фильтр, 16 — пьезомодулятор, 17 — камера с объектом, 18 — фотоумножитель, 19 — система питания и регистрации

В некоторых приборах призмы изготовлены из расплавленного кварца, и в этом случае луч света оказывается монохроматичным, но не поляризованным. Для линейной поляризации монохроматического луча на его пути помещают дополнительно призму Рошона. Линейно поляризованный свет далее преобразуется в свет с левой и правой круговой поляризацией с помощью специального устройства — пьезомодулятора. Пьезомодулятор формирует с помощью кварцевого элемента (на основе пьезоэлектрического эффекта) из проходящего через него светового пучка свет с круговой поляризацией.

При подаче на электроды пьезомодулятора переменного напряжения линейно поляризованный свет становится после прохождения через пьезокристалл эллиптически поляризованным. Эллиптичность поляризации изменяется в такт с частотой переменного напряжения. При некотором оптимальном напряжении свет, проходящий через кристалл, приобретает левую или правую круговую поляризацию. Если в луч такого света с круговой поляризацией поместить оптически активное вещество, то интенсивность света, прошедшего через это вещество, будет изменяться во времени. Сигнал, регистрируемый с помощью специальной электрической схемы, пропорционален разнице в поглощении лучей с правой и левой круговой поляризацией.

## § 7. Флуоресцентная спектроскопия. Общие закономерности, лежащие в основе флуоресцентной спектроскопии

Фотопроцессы в биологических системах сопровождаются возникновением электронно-возбужденных состояний, характеризующихся определенной энергией, временем жизни, структурными свойствами. По сравнению с поглощением испускание света происходит в течение более длительного времени. В этот период в молекулярных структурах происходит ряд изменений, которые оказывают влияние на спектры флуоресценции системы, позволяющие получить информацию об ее электронно-возбужденных состояниях.

Полная энергия состояния молекулы,  $E$  складывается из энергии электронного возбуждения  $E_e$ , колебательной энергии  $E_v$  и вращательной энергии  $E_r$ . Таким образом, при поглощении кванта света молекулой полное изменение энергии можно представить в следующем виде:  $h\nu = \Delta E_e + \Delta E_v + \Delta E_r$ . Энергия вращательных квантов меньше, чем колебательных, а их энергия, в свою очередь, меньше энергии электронных ( $E_r \approx 10^{10}$  Гц,  $E_v \approx 10^{13}$ ,  $E_e \approx 10^{16}$  Гц).

Возможные электронные переходы и энергетические состояния молекулы обычно представляются в виде схемы уровней энергии, где каждый электронный уровень расщепляется на ряд колебательных подуровней, а каждый колебательный — на ряд вращательных подуровней (рис. 13).

При поглощении кванта света молекулой осуществляется переход с самого нижнего колебательного подуровня основного состояния (комнатная температура) на возбужденные уровни  $S_1^*$  и  $S_2^*$ , характеризующиеся колебательными и вращательными подуровнями. В молекулах большинства соединений при возбуждении электронных состояний, расположенных выше первого  $S_1^*$ , происходит быстрая внутренняя конверсия (с временами порядка  $10^{-13}$  с) за счет перехода с нижнего колебательного подуровня верхнего состояния  $S_2^*$  на верхний колебательный подуровень нижнего состояния  $S_1^*$  с последующей релаксацией на самый нижний колебательный подуровень возбужденного состояния  $S_1^*$ . Это означает, что в какое бы возбужденное состояние ни попала молекула (например, в состояние  $S_2^*$ ), в течение  $10^{-13} - 10^{-12}$  с она перейдет на нижний колебательный подуровень первого электронного состояния  $S_1^*$ . Именно с этого уровня при переходе на любой колебательно-вращательный подуровень основного состояния  $S_0$  и происходит излучение — *флуоресценция*.

Отсюда следует, что спектр флуоресценции  $I_{\text{фл}} = f(\lambda_{\text{фл}})$ , т. е. зависимость интенсивности флуоресценции  $I_{\text{фл}}$  от длины волны  $\lambda_{\text{фл}}$ , и *квантовый выход* флуоресценции  $\varphi = n_{\text{фл}}/n_{\text{погл}}$  (где  $n_{\text{фл}}$  и  $n_{\text{погл}}$  — число квантов флуоресценции и поглощенных квантов) не зависят от длины волны возбуждающего света. Независимость спектра и квантового выхода флуоресценции от энергии поглощенного молекулой кванта называется *законом Вавилова*.

Поскольку энергия поглощенного кванта частично растрачивается на тепловые колебания, энергия кванта флуоресценции оказывается меньшей, т. е. спектр флуоресценции сдвинут в длинноволновую сторону относительно наиболее длинноволновой полосы поглощения (*закон Стокса*). Форма полос флуоресценции определяется распределением колебательных подуровней основного состояния, т. е. отражает колебательную структуру основного состояния  $S_0$ .

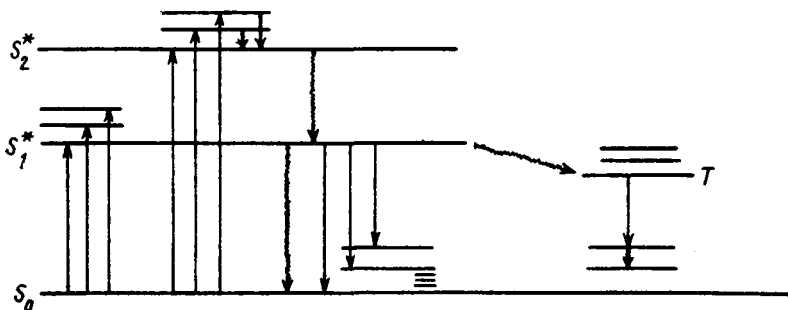


Рис. 13. Энергетические уровни молекулы (объяснение см. в тексте):

$S_0$  — основное состояние,  $S_1^*$  и  $S_2^*$  — возбужденные синглетные уровни,  $T$  — триплетный уровень

Часто распределение колебательных подуровней по энергиям у основного и возбужденного состояний одинаково; следовательно, полосы флуоресценции и поглощения будут зеркально симметричны относительно так называемого (0 — 0)-перехода (единственный переход, имеющий одинаковую энергию поглощения и флуоресценции).

Приведенная выше схема уровней не объясняет, почему спектры поглощения и флуоресценции не представляют собой совокупности полос одинаковой интенсивности в коротковолновой и длинноволновой областях соответственно, а амплитуды полос существенно различаются в реальных спектрах. Это объясняет принцип Франка—Кондона, который основан на том, что поглощение происходит за короткие времена ( $\sim 10^{-15}$  с) и при этом положение и импульсы относительно тяжелых ядер атомов молекулы практически не изменяются.

Зависимость потенциальной энергии системы от координат ядер многоатомной молекулы в основном и возбужденном состояниях различается. В наиболее простом случае (двухатомная молекула) минимумы кривых потенциальных энергий в основном и возбужденном состояниях сдвинуты, поскольку орбиталь, заполняемая электроном в возбужденном состоянии, занимает большую область пространства, чем в основном состоянии, и положение равновесия в возбужденном состоянии, следовательно, соответствует большему межъядерному расстоянию. Кроме того, форма таких потенциальных кривых в основном и возбужденном состояниях также различается (рис. 14). В соответствии с принципом Франка — Кондона наиболее вероятным будет такой переход, при котором не произойдет изменений ни в положении ядер, ни в импульсе (*принцип вертикальности перехода* между двумя электронными состояниями).

Решение волнового уравнения показывает, что хотя при поглощении кванта света возможны различные переходы, однако наиболее вероятным будет переход, обозначенный сплошной стрелкой вверх на рис. 14. Иными словами, наиболее вероятное межъядерное расстояние для молекулы с нулевой колебательной энергией соответствует средней точке  $AB$ . В случае флуоресценции наиболее вероятным будет испускание из средней точки  $CD$  (сплошная стрелка вниз), что соответствует наиболее интенсивной полосе спектра.

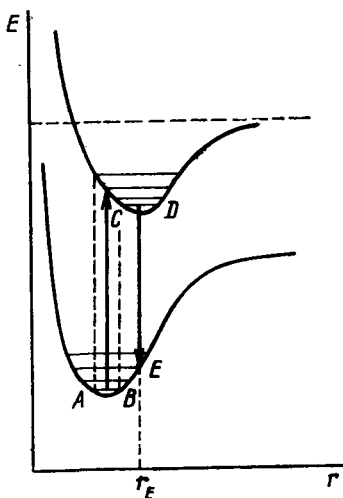


Рис. 14. Зависимость потенциальной энергии ( $E$ ) системы от координат ядер ( $r$ ) молекулы в основном и возбужденном состояниях

Форма спектра флуоресценции зависит от относительного взаиморасположения минимальных значений на кривых потенциальных энергий основного и возбужденного состояний. В большинстве случаев эти минимумы сдвинуты не сильно, а потенциальная кривая для основного состояния возрастает с большей скоростью на участке  $r > r_E$  по сравнению с участком, где  $r < r_E$ , поэтому интенсивность флуоресценции более резко уменьшается в коротковолновой области по сравнению с длинноволновой. Интенсивность поглощения, наоборот, более круто спадает в длинноволновой области, что связано с резким возрастанием потенциальной кривой с уменьшением  $r$  (левая ветвь кривой). Органические молекулы имеют достаточно сложный набор колебательных уровней, поэтому вместо последовательности отчетливых максимумов (соответствующих простой серии колебательных уровней) в спектре сложных молекул наблюдается широкая полоса.

Флуоресценция происходит с самого нижнего колебательного уровня первого возбужденного состояния при переходе молекулы в основное состояние. Для идеальных флуоресцирующих молекул ( $\varphi = 1$ ) необходимо допустить, что в стационарных условиях число актов испускания за 1 с будет равно числу актов поглощения, т. е. все переходы из возбужденного уровня на основной будут сопровождаться флуоресценцией.

В реальных ситуациях квантовый выход обычно меньше единицы, поскольку с флуоресценцией конкурируют безызлучательные процессы. Один из таких процессов — это внутренняя конверсия из нижнего колебательного подуровня первого электронно-возбужденного состояния  $S_1^*$  в основное  $S_0$  за времена порядка  $10^{-9}$  с, когда энергия возбуждения теряется, например, при столкновении с молекулами растворителя или рассеивается по внутренним колебательным степеням свободы. Другими безызлучательными процессами могут быть интеркомбинационная конверсия с переходом в триплетное возбужденное состояние, сопровождающееся изменением спина, миграция энергии, фотохимическая реакция или дезактивация за счет тушения флуоресценции при взаимодействии с молекулами тушителя  $Q$ .

При отсутствии безызлучательных процессов ( $\varphi = 1$ ) длительность пребывания молекулы в возбужденном состоянии определяется *радиационным, или естественным, временем жизни*  $\tau_R$ .

При возбуждении  $n_0$  молекул, когда  $\varphi = 1$ , скорости испускания (флуоресценции)  $I$  или, иными словами, число флуоресцирующих молекул за 1 с должно быть равно скорости поглощения и пропорционально числу молекул ( $n$ ) в системе в момент времени  $t$ :

$$I = -(dn/dt) = k_f n = k_f n_0 e^{-k_f t} = I_0 e^{-k_f t},$$

где  $k_f$  — константа скорости флуоресценции,  $I$  (квант/с).

Естественное время жизни возбужденного состояния связано с константой скорости флуоресценции соотношением  $\tau_R = 1/k_f$ .



Затухание флуоресценции после прекращения возбуждения подчиняется экспоненциальному закону

$$I = I_0 e^{-t/\tau_R} \text{ или } \ln I = \ln I_0 - (t/\tau_R).$$

Естественное время жизни возбужденного состояния  $\tau_R$  можно оценить с помощью молярного коэффициента поглощения  $\epsilon$ . С некоторым приближением можно считать, что чем больше константа скорости поглощения, тем быстрее происходит излучение, т. е. тем больше константа скорости флуоресценции ( $k_f = 1/\tau_R$ ). В соответствии с формулой Боуэна и Уокса

$$k_f = 1/\tau_R = 2900n^2 \tilde{\nu}_0^3 \int \epsilon d\tilde{\nu},$$

где  $\tilde{\nu}_0$  — волновое число в максимуме полосы поглощения,  $\int \epsilon d\tilde{\nu}$  — площадь под контуром спектральной кривой поглощения,  $n$  — показатель преломления среды.

Поскольку это уравнение соответствует случаю ( $\varphi = 1$ ), а силу диполя и частоту легко найти из спектров поглощения,  $k_f$  можно определить не измеряя флуоресценцию. В действительности квантовый выход флуоресценции меньше единицы вследствие существования в молекуле безызлучательных процессов; следовательно, реальное (или измеряемое) время жизни  $\tau_f$  окажется меньше:

$$\tau_f = \frac{1}{k_f + k_d + k_{ic} + k_q [Q]},$$

где  $k_d$  — константа внутренней конверсии,  $k_{ic}$  — константа интеркомбинационной конверсии в триплетное состояние,  $k_q [Q]$  — произведение бимолекулярной константы на концентрацию тушащих молекул.

Квантовый выход флуоресценции в этом случае выражается соотношением

$$\varphi_f = \frac{k_f}{k_f + k_d + k_{ic} + k_q [Q]}.$$

Отсюда следует, что  $\tau_f = \tau_R \varphi_f$ ;  $k_f = \varphi_f / \tau_f$ . Поскольку радиационное, или естественное, время жизни возбужденного состояния  $\tau_R$  можно рассчитать из спектров поглощения, измерение времени затухания флуоресценции  $\tau_f$  эквивалентно измерению квантового выхода  $\varphi_f$ . В отсутствие тушителя  $k_q [Q]$  квантовый выход флуоресценции, обозначенный в этих условиях как  $\varphi_f^0$ , очевидно, зависит лишь от трех вышеперечисленных констант:

$$\varphi_f^0 = k_f / (k_f + k_d + k_{ic}).$$

Так как  $\varphi_f^0 / \varphi_f = 1 + k_q [Q] / (k_f + k_d + k_{ic})$ , то, обозначив через  $\tau_f^0$  время жизни в отсутствие тушителя, получим, что  $1/\tau_f^0 = k_f + k_d + k_{ic}$  и  $(\varphi_f^0 / \varphi_f) - 1 = \tau_f^0 k_q [Q] = K [Q]$ .

Последнее уравнение называется *соотношением Штерна и Фольмера*, а  $K$  — *константой тушения*. Последняя легко определяется экспериментально при измерении интенсивностей флуоресценции различных образцов, отличающихся концентрацией тушителя. Для этого достаточно оценить угловой коэффициент прямой в координатах  $[I_f/I_i - 1]$  и  $[Q]$ .

Так как для многих полос поглощения полуширина  $\Delta\tilde{\nu}_{1/2}$  составляет около  $2000-5000 \text{ см}^{-1}$ , а их площадь можно грубо аппроксимировать площадью треугольника с вершиной в точке  $\epsilon_{\max}$ , где  $\epsilon_{\max}$  — максимальный коэффициент поглощения полосы, то  $\int \epsilon d\tilde{\nu} \approx 0,3 \epsilon_{\max}$ . Отсюда следует, что для приближенных оценок естественного времени жизни возбужденного состояния  $1/\tau_R = 10^4 \epsilon_{\max}$  (см. с. 41);  $n^2 = 2$ . Для молекул многих красителей, у которых  $\epsilon_{\max} = 10^5$ ,  $\tau_R$  составит около  $10^{-9}$  с.

Так как  $\tau_R$  связано с силой осциллятора ( $f$ ) выражением  $\tau_R = 1,5 \cdot 10^{-8} / (f \tilde{\nu}_0^2)$  и в то же время  $\tau_R = 1 / (2900 n^2 \tilde{\nu}_0^2 \int \epsilon d\tilde{\nu})$ , то при  $n = 2$  получается, что  $f = 4,3 \cdot 10^{-6} \int \epsilon d\tilde{\nu}$ . При  $\epsilon_{\max} \approx 10^5$  сила  $f$  близка к единице.

Исходя из определения квантового выхода флуоресценции, с использованием закона Ламберта — Бэра можно установить связь между интенсивностью флуоресценции  $I$  и молярным коэффициентом поглощения, а также концентрацией  $c$ :

$$I = KI_0(1 - T)\varphi,$$

где  $I_0$  — интенсивность возбуждающего света,  $(1 - T)$  — величина поглощения,  $T$  — величина пропускания,  $K$  — коэффициент пропорциональности, зависящий от способа измерения.

Так как  $D = -\lg T = \epsilon cl$ , где  $D$  — оптическая плотность,  $c$  — концентрация,  $l$  — толщина слоя вещества, то  $I = KI_0(1 - 10^{-D})\varphi$ . Выражение в скобках можно разложить в ряд при небольших значениях  $D$  и ограничиться линейным членом:

$$I \approx 2,3KI_0\epsilon cl\varphi.$$

Это означает, что при малых оптических плотностях ( $D \leq 0,1 \div 0,2$ )  $I$  пропорциональна концентрации флуоресцирующего вещества и интенсивности возбуждающего света. По этой причине флуоресцентная спектрофотометрия гораздо более чувствительный метод определения концентраций, чем абсорбционная спектрофотометрия, поскольку чувствительность флуориметра практически ограничивается только максимальной интенсивностью возбуждающего света, а не точностью измерения интенсивности, что необходимо для определения разности  $(I_0 - I_f)$  при абсорбционном методе. Например, если точность измерения  $\lg(I_0/I)$  на абсорбционном спектрофотометре составляет около  $10^{-3}$ , а  $\epsilon_{\max}$  обычно не превышает  $10^5$  (для большинства красителей), то минимальная концентрация, которую можно определить, будет не менее  $10^{-3}/10^5 = 10^{-8} \text{ M}$ , тогда

как флуоресцентным методом можно обнаружить концентрации порядка  $10^{-10} - 10^{-12}$  М.

Точное измерение интенсивности флуоресценции осложняется целым рядом факторов: реабсорбцией флуоресценции, экранированием возбуждающего света другими молекулами, светорассеянием, гетерогенностью объекта, миграцией энергии, тушением флуоресценции. Существует целый ряд специальных приемов, позволяющих значительно уменьшить неблагоприятное влияние указанных выше факторов, которые будут рассмотрены позднее.

Как влияет температура на квантовый выход флуоресценции  $\varphi_f$ ? В наиболее простом варианте для разбавленных растворов с повышением температуры интенсивность флуоресценции уменьшается за счет внутримолекулярной деградации энергии возбуждения (если исключить межмолекулярные столкновения за время жизни возбужденного состояния). Если рассмотреть пересекающиеся кривые потенциальной энергии возбужденного  $S_1^*$  и основного  $S_0$  состояний, то с увеличением температуры на верхние колебательные уровни  $S_1^*$  попадает все большая часть молекул и возрастает вероятность перехода через область пересечения потенциальных кривых. Это означает, что термическая энергия используется на преодоление энергетического барьера потенциальной энергии высотой  $\Delta E$ , который отделяет устойчивое состояние  $S_1^*$  от перехода на  $S_0$  (рис. 15).

Обозначив суммарную константу безызлучательных процессов ( $k_d + k_{ic}$ ) через  $k_n$  в отсутствие тушения, получим, что  $\varphi_f^0 = k_f / (k_f + k_n)$ . С увеличением температуры  $k_n$  будет возрастать за счет возрастания констант скоростей внутренней конверсии и интеркомбинационной конверсии в триплетное состояние, поскольку преодолевается энергетический барьер  $\Delta E$  (рис. 15) в области пересечения потенциальных кривых. При уменьшении температуры  $k_d$  и  $k_{ic}$  будут приближаться к тем предельным значениям, которые соответствуют внутренней или интеркомбинационной конверсии с самого нижнего колебательного уровня первого синглетного состояния. Это означает, что если при комнатной температуре квантовый выход близок к единице, то величина  $\varphi_f^0$  мало изменится с понижением температуры, однако может значительно уменьшиться при повышении температуры. Если квантовый выход флуоресценции вещества при комнатной температуре незначителен, то с понижением температуры он может существенно возрасти. Так как можно ожидать, что  $k_f$  не зависит от температуры, то изменения  $\varphi_f^0$  отражают температурную зависимость  $k_n$ . Эта зависимость будет определяться наименьшим активационным барьером с энергией  $E$

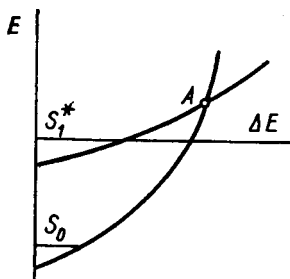


Рис. 15. Кривые потенциальной энергии для  $S_1^*$  и  $S_0$ , пересекающиеся в точке А:  $\Delta E$  — энергетический барьер

на пути плавного перехода с уровня  $S_1^*$  на  $S_0$  и  $T$  и описываться уравнением Больцмана

$$k_n = k_n^0 e^{-E/(kT)}.$$

Отсюда

$$1/\varphi_f^0 = 1 + (k_n/k_f) = 1 + (k_n^0 e^{-E/(kT)}/k_f) = 1 + \tau_R k_n^0 e^{-E/(kT)},$$

где  $\tau_R$  — естественное время жизни возбужденного состояния ( $\tau_R = 1/k_f$ ). Величина  $\tau_R k_n^0 = K$  постоянна, и поэтому  $1/\varphi_f^0 = 1 + K e^{-E/(kT)}$  или  $-\ln \varphi_f^0 = \ln K - E/(kT)$ . Зависимость  $\ln \varphi_f^0$  от  $1/T$  позволяет определить величину энергии активации температурного тушения флуоресценции  $E$ . Так как  $1/\varphi_f = 1 + K e^{-E/(kT)}$ , то с уменьшением температуры квантовый выход должен возрастать по S-образной кривой, что экспериментально наблюдается для разбавленных растворов флуоресцирующих веществ.

Экспериментально определяемая величина энергии активации для ряда веществ (анилин, антрацен, диацетил) имеет значения в пределах 17—42 кДж/моль, а коэффициент  $K$  при этом подчиняется эмпирическому уравнению  $K = \text{const} (T/\eta)^{1/4}$ , где  $\eta$  — вязкость растворителя. Таким образом, для термической деградации электронной энергии возбуждения необходимо не только преодолеть энергетический барьер, но и иметь некоторую свободу во взаимном перемещении частей молекулы, что зависит от вязкости среды. Очевидно также, что в присутствии тушителя при возрастании  $T$  интенсивность флуоресценции уменьшится вследствие увеличения вероятности столкновений молекул тушителя и флуоресцирующего вещества.

## § 8. Методы измерения спектров флуоресценции и возбуждения

Исследование спектров флуоресценции — зависимости интенсивности излучения от длины волны [ $I_{\text{фл}} = f(\lambda_{\text{фл}})$ ] — позволяет проводить качественный и количественный анализ различных компонентов в биологических и модельных системах, изучать их состояние (агрегацию, комплексообразование и т. п.) и взаимодействие с другими компонентами.

По положению максимума в спектре флуоресценции можно судить о величине кванта энергии, запасаемой в молекуле данного компонента; сравнение спектров флуоресценции и поглощения дает информацию о миграции энергии в системе. Скорость затухания флуоресценции позволяет судить о времени сохранения энергии возбуждения в молекуле, что в сочетании со значениями квантовых выходов и скоростями тушения флуоресценции дает возможность проанализировать процессы растраты и миграции энергии.

Для измерения спектров флуоресценции и ее возбуждения обычно используют установку с двумя монохроматорами (на возбуждении и регистрации), где источником служит ксеноновая лампа или лампа накаливания, а приемником излучения — фотоумножитель. Принципиальная схема такой установки показана на рис. 16.

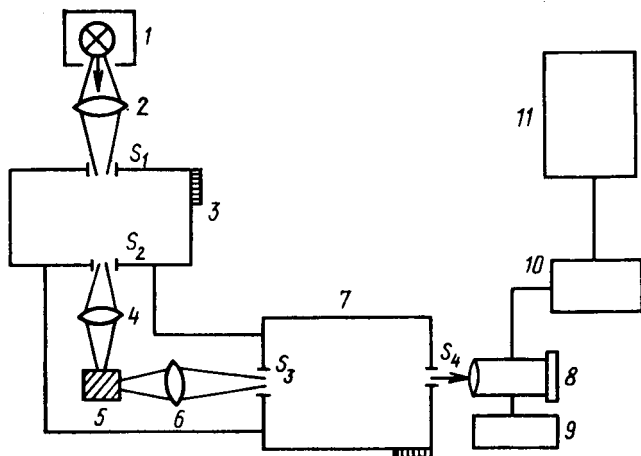


Рис. 16. Схема установки для измерения спектров флуоресценции и возбуждения флуоресценции:

1 — источник возбуждающего света, 2, 4, 6 — фокусирующие линзы, 3 — первый (возбуждающий) монохроматор, 5 — кювета с образцом, 7 — второй (регистрирующий) монохроматор, 8 — фотоумножитель, 9 — источник питания фотоумножителя, 10 — усилитель, 11 — потенциометр;  $S_1$ — $S_4$  — щели монохроматоров

При измерении спектров флуоресценции и возбуждения по однолучевой схеме на установках указанного выше типа возможны искажения спектральных кривых за счет неодинаковой интенсивности излучения источника возбуждающего света при разных длинах волн и зависимости чувствительности фотокатода фотоумножителя от длины волны падающего на него излучения. Пропускание света всей спектральной установкой также селективно. По этим причинам записанные спектры необходимо корректировать в соответствии со спектральной чувствительностью установки, поскольку измеряемый фототок не пропорционален интенсивности излучения  $I(\lambda)$ .

Суммарная мощность излучения  $W(\lambda)$ , равная общей площади под кривой профиля полосы  $\int_0^{\infty} I(\lambda) d\lambda$ , обратно пропорциональна произведению функции спектральной чувствительности фотоумножителя  $G(\lambda)$  на пропускание прибора  $T(\lambda)$  и прямо пропорциональна величине измеренного фототока  $J(\lambda)$ :

$$W(\lambda) = \int_0^{\infty} I(\lambda) d\lambda = J(\lambda) / [G(\lambda) T(\lambda)].$$

Это означает, что для измерения мощности и определения значений спектральной интенсивности излучения  $[I(\lambda) = W(\lambda) / \Delta\lambda]$  необходимо получить систему коэффициентов  $K_\lambda = 1/[G(\lambda) T(\lambda)]$ ,

на которые следует умножить регистрируемую спектральную кривую для построения истинного спектра флуоресценции. Такие коэффициенты можно получить при измерении на установке спектров эталонных источников с известным спектральным распределением мощности.

Точное измерение интенсивности флуоресценции  $I(\lambda)$ , как уже отмечалось выше, существенно осложняется вследствие эффектов светорассеяния, экранирования возбуждающего света другими молекулами, реабсорбции флуоресценции, миграции энергии и тушения флуоресценции. Как правило, интенсивность флуоресценции биологических объектов незначительна из-за малой величины квантовых выходов и низкой концентрации флуоресцирующих компонентов. Все это требует увеличения чувствительности измеряющей аппаратуры, тщательной фокусировки света и специального выбора оптимальных условий регистрации флуоресценции, позволяющих исключить влияние «паразитного» свечения кювет, оптики и возможных примесей.

При измерении спектров флуоресценции биологических объектов необходимо также учитывать влияние интенсивного возбуждающего света на индуцируемые изменения фотохимически активных компонентов. Чтобы ослабить влияние возбуждающего света на фотоиндуцируемые процессы, следует по возможности уменьшать яркость возбуждающего света на объекте за счет тщательной фокусировки, увеличивать скорость измерений и, если позволяют условия эксперимента, использовать низкотемпературную технику. Для успешного решения этих задач применяют светосильные монохроматоры, чувствительные приемники света и охлаждение образцов вплоть до температуры жидкого азота (77 К).

Биологические объекты обычно сильно рассеивают свет, что приводит к увеличению экранирующего эффекта и реабсорбции (поглощение света флуоресценции как исследуемым компонентом, так и другими компонентами) вследствие увеличения оптического пути. В наиболее простых ситуациях эффект экранирования можно учесть, если известны значения оптической плотности исследуемого вещества  $D$  и общая оптическая плотность образца  $D_{06}$  при определенной длине волны возбуждения. В этом случае измеряемая интенсивность флуоресценции может быть исправлена с учетом эффекта экранирования в соответствии с уравнением, предложенным Ю. А. Владимировым и Ф. Ф. Литвиным:

$$I'_f = KI_0(1 - 10^{-D})\varphi(D/D_{06}),$$

где  $I'_f$  — интенсивность флуоресценции при наличии экранирования. Поправочный коэффициент  $m$ , на который необходимо умножить регистрируемую интенсивность вещества в смеси, можно найти из соотношения

$$m = I_f/I'_f = (1 - 10^{-D})D_{06}/(1 - 10^{-D_{06}})D.$$

В сильно разбавленных образцах, где  $D_{об} \ll 1$ , коэффициент  $m \approx 1$  и, следовательно, нет необходимости вводить поправки на экранирование возбуждающего света.

Можно учесть также и эффект реабсорбции, приводящий к уменьшению коротковолновой части регистрируемой флуоресценции и сдвигу максимума в длинноволновую область по сравнению с истинным спектром излучения. Поправочный коэффициент на реабсорбцию  $m'$  аналогичен коэффициенту при экранировании возбуждающего света:

$$m' = \frac{(1 - 10^{-D})(D + D_a)}{[1 - 10^{-(D + D_a)}]D},$$

где  $D_a$  — оптическая плотность всех реабсорбирующих веществ при длине волны регистрации флуоресценции. Видно, что при достаточно малых  $D$  и  $D_a$   $m' \approx 1$ . Таким образом, эффект реабсорбции снижается при уменьшении оптической плотности образца. Это достигается за счет уменьшения концентрации вещества и толщины исследуемого образца, возбуждением и регистрацией флуоресценции с передней стенки кюветы, возбуждением флуоресценции с максимуме поглощения вещества.

Для уменьшения светорассеяния в образце обычно используют специальные приемы, например инфльтрацию листьев растений водой, добавление глицерина к суспензии хлоропластов или хромофоров и т. п. Для уменьшения интенсивности рассеянного света в монохроматоре перед входной щелью помещают светофильтры, которые пропускают свет только в исследуемом спектральном диапазоне (поэтому необходимо знать спектральный состав рассеянного света, зависящий от распределения энергии в спектре излучения источника и от монохроматора). Определенные преимущества имеют спектрофотометры с двойным монохроматором, позволяющим в значительной мере избавиться от «паразитного» рассеянного света.

Ранее уже отмечалось, что при малых концентрациях вещества в растворе поглощение пропорционально оптической плотности и концентрации люминесцирующего вещества:  $(1 - T) \sim D \sim c$ . Таким образом, для определения концентрации вещества достаточно сравнить интенсивности флуоресценции исследуемого раствора и контрольного раствора известной концентрации. Тогда  $c_x = cI_x/I$ , где  $c_x$  — определяемая концентрация вещества, флуоресцирующего с интенсивностью  $I_x$ ,  $c$  — концентрация вещества, флуоресцирующего с интенсивностью  $I$  в контрольном растворе. Поскольку с повышением концентрации величина  $(1 - T)$  уже не пропорциональна  $c$ , интенсивность люминесценции начиная с определенного предела не будет зависеть от концентрации вещества. Поэтому в концентрированных растворах количественные определения концентрации по интенсивности флуоресценции практически невозможны.

Метод регистрации спектров собственной флуоресценции различных биомолекул или специальных *флуоресцентных зондов*

(меток), вводимых в изучаемую макромолекулу (или биоструктуру), — удобный инструмент для конформационного анализа. Различают флуоресцентные зонды-красители, которые связываются с биологическими мембранами нековалентно, и флуоресцентные метки, связанные химической связью. При включении метки (зонда) в макромолекулу или биомембрану флуоресцентные свойства таких красителей изменяются и дают информацию о структурных особенностях изучаемой системы. Флуоресцентные зонды, слабо флуоресцирующие в воде (например, анилинонафталинсульфонат), значительно увеличивают свой квантовый выход при связывании с белками и нуклеиновыми кислотами. При изменении свойств микроокружения в месте связывания зонда (заряда, микровязкости и т. п.) меняются интенсивность и спектр флуоресценции, отражающие конформационные перестройки изучаемой биоструктуры или макромолекулы.

Измерение спектров флуоресценции таких присоединенных меток и зондов особенно важно при изучении свойств нуклеиновых кислот вследствие малой интенсивности собственной флуоресценции их оснований. Относительная чувствительность метода с использованием флуоресцентных зондов существенно превышает соответствующее значение и для большинства собственных хромофоров белков. Флуоресценция обычно гораздо более чувствительна к окружению хромофора, чем поглощение. Кроме того, поскольку поглощение происходит за время порядка  $10^{-15}$  с, свойства молекулы и ее окружения практически не успевают измениться. Однако в возбужденном состоянии молекула пребывает более длительное время ( $10^{-9}$  —  $10^{-8}$  с), поэтому в течение этого периода могут произойти различные процессы (например, локальные конформационные изменения, протонирование и депротонирование, релаксация молекул растворителя и т. п.), которые отразятся на флуоресцентных свойствах самой молекулы или соответствующего зонда.

Действительно, хорошо известно, что положение полосы в спектре флуоресценции гораздо сильнее изменяется в зависимости от природы растворителя, чем в соответствующем спектре поглощения. Это явление отражает влияние переориентации диполей молекул растворителя на положение возбужденного синглетного уровня растворенной молекулы, который за счет увеличения энергии сольватации понижается. Таким образом, метод флуоресцентной спектроскопии по целой совокупности свойств оказывается более чувствительным, чем абсорбционный метод.

При освещении флуоресцирующего объекта монохроматическим светом интенсивность флуоресценции  $I_f$  будет различаться при разных длинах волн возбуждающего света  $\lambda_n$ , поскольку  $I_f$  зависит от интенсивности падающего (возбуждающего) света  $I_0$  при каждой длине волны и от величины поглощения  $(1 - T)$ :

$$I_f = I_0 K (1 - T) \varphi,$$



где  $K$  — коэффициент, характеризующий чувствительность регистрирующего прибора,  $\varphi$  — квантовый выход.

*Спектром возбуждения* флуоресценции называется зависимость интенсивности флуоресценции от длины волны возбуждающего света:

$$I_f/I_0 = K(1 - T)\varphi = f(\lambda).$$

Если квантовый выход постоянен, то спектр возбуждения флуоресценции будет совпадать по форме с кривой поглощения  $(1 - T) = f(\lambda)$ . При небольшом поглощении величина  $(1 - T)$  пропорциональна оптической плотности  $D$  и  $I_f/I_0 \approx 2,3 K\varphi D$ , т. е. при малых  $D$  (например, в разбавленных растворах индивидуальных веществ) спектр возбуждения флуоресценции вещества по формуле совпадает с его спектром поглощения.

Если  $(1 - T) = 1$  (полное поглощение возбуждающего света), спектр возбуждения отражает зависимость квантового выхода от длины волны возбуждающего света:  $I_f/I_0 = K\varphi$ . Таким образом, для концентрированных растворов вещества спектр возбуждения постоянен и не зависит от длины волны возбуждающего света, что соответствует закону Вавилова о независимости  $\varphi$  от  $\lambda_v$ .

Схема для измерения спектров возбуждения флуоресценции приведена на рис. 16. В отличие от регистрации спектров флуоресценции при измерении спектров возбуждения непрерывная развертка по длинам волн осуществляется на первом (возбуждающем) монохроматоре, в то время как второй (регистрирующий) монохроматор настроен на определенную длину волны флуоресценции. Для получения истинного спектра возбуждения необходимо определить интенсивность возбуждающего света при различных длинах волн  $I_0 = f(\lambda)$ . Для этого обычно измеряют относительную энергию на выходе монохроматора с помощью неселективного приемника света (болметра или термпары), а затем пересчитывают ее на количество квантов. При отсутствии неселективных приемников (например, в ультрафиолетовой области) применяют стандартные флуоресцирующие образцы с постоянным  $\varphi$ , которые полностью поглощают падающий свет, трансформируя его затем во флуоресценцию, измеряемую фотоумножителем (флуоресцин, триптофан и ряд других веществ соответствующей концентрации; флуоресцирующий светофильтр ЖС-9). Затем, разделив  $I_f = f(\lambda)$  на  $I_0 = f(\lambda)$ , при каждом значении  $\lambda$  (например, через 1,5—2 нм) получают спектр возбуждения исследуемого компонента.

Измерение спектров возбуждения флуоресценции имеет важное значение для решения целого ряда задач. Так, спектр возбуждения дает возможность установить спектр поглощения компонента, который флуоресцирует в исследуемой спектральной области, что позволяет идентифицировать этот компонент. Было установлено, например, что спектр возбуждения растворов белков, флуоресцирующих в диапазоне 300—370 нм, совпадает со спектром поглощения

триптофана. Это означает, что за флуоресценцию белковых молекул в указанной области ответствен исключительно триптофан.

Важно подчеркнуть, что метод измерения спектров возбуждения особенно удобен для тех образцов, на которых прямые абсорбционные измерения затруднены. Сравнительное изучение спектров возбуждения и флуоресценции позволяет обнаружить миграцию энергии возбуждения между различными компонентами в сложных системах. Так, если в двухкомпонентных системах флуоресцирует только один компонент, а в спектре возбуждения этой флуоресценции зарегистрированы полосы, соответствующие поглощению обоих компонентов, это означает, что в данной системе происходит миграция энергии с одного компонента на другой. Именно таким образом была обнаружена миграция энергии с каротиноидов и хлорофилла *b* на хлорофилл *a* в высших растениях и зеленых водорослях, которая осуществляется практически со 100%-ной эффективностью. Можно было бы привести и целый ряд других примеров. Необходимо обратить внимание еще раз на то, что измерения спектров возбуждения следует проводить при малых значениях оптических плотностей ( $D$  в максимуме поглощения должна составлять не более 0,1—0,2 единиц). Количественная оценка миграции энергии для простой двухкомпонентной системы (смесь веществ  $A$  и  $B$ ) может производиться с использованием соотношения

$$q = (n_A/n_0) (1/D_A) [D_B/(n_B/n_0)] = n_A D_B / (D_A n_B),$$

где  $D_A$ ,  $D_B$ ,  $n_A/n_0$ ,  $n_B/n_0$  — компоненты разложения суммарного спектра поглощения и возбуждения, соответствующие поглощающим веществам  $A$  и  $B$ . Если, например, в такой двухкомпонентной системе отсутствует миграция энергии с  $A$  на  $B$ , то в спектрах возбуждения при регистрации в полосе флуоресценции вещества  $B$  будет наблюдаться лишь максимум, соответствующий поглощению  $B$  ( $q = 0$ ), тогда как при полной миграции с  $A$  на  $B$  в таком спектре появится второй максимум, совпадающий по всем параметрам с максимумом поглощения вещества  $A$  ( $q = 1$ ; 100%-ная эффективность). Во всех промежуточных ситуациях (различная эффективность миграции с  $A$  на  $B$ ) в спектрах возбуждения флуоресценции  $B$  интенсивность полосы, соответствующей поглощению  $A$ , будет варьировать ( $0 < q < 1$ ).

Аналогом спектра возбуждения флуоресценции можно считать *спектр действия*, т. е. зависимость какого-либо эффекта  $P$  (биологического, фотохимического и т.п.), отнесенного к числу падающих квантов  $n_0$ , от длины волны возбуждающего света:  $P/n_0 = f(\lambda)$ . Измерение спектра действия — очень важный метод для идентификации компонентов, ответственных за тот или иной процесс, для выяснения механизма его отдельных стадий. При этом спектры действия обычно сопоставляют со спектрами поглощения целой системы и ее отдельных компонентов. Регистрация спектров действия — необходимый этап исследования фотобиологических процессов. Так

же как и для флуоресценции, существует понятие *квантового выхода*  $\Phi$ , определяемого как отношение эффекта (например, числа прореагировавших молекул) к количеству поглощенных квантов (числу молекул, поглотивших кванты)  $n_{\text{погл}}$ :

$$\Phi = P/n_{\text{погл}} = P/[n_0(1 - T)].$$

Отсюда ясно, что спектр действия можно выразить следующим соотношением:

$$\frac{P}{n_0} = K(1 - T)\Phi = f(\lambda),$$

где  $\Phi$  — квантовый выход фотопроцесса,  $(1 - T)$  — поглощение. В отличие от флуоресценции величина эффекта для фотобиологических процессов не прямо пропорциональна интенсивности действующего света и насыщается при увеличении  $I_0$ .

Таким образом,  $\Phi$  является функцией  $I_0$  и, как правило, уменьшается с возрастанием интенсивности действующего света, что создает определенные трудности при измерении спектров действия фотобиологических процессов. Однако эти трудности могут быть преодолены, если применять высокочувствительную технику для регистрации исследуемого фотобиологического эффекта и при этом использовать ненасыщающие интенсивности света (т. е. линейный участок зависимости эффективности от  $I_0$ ). Измерив затем величины эффекта при разных длинах волн возбуждения, делят получаемые значения на интенсивность падающего света (в квантах) при каждой длине волны и получают спектр действия фотопроцесса.

При другом способе измерения спектров действия фотобиологического процесса выбирают такую интенсивность возбуждающего света, которая индуцирует одинаковый фотобиологический эффект при всех длинах волн. Таким образом, эффективность процесса будет обратно пропорциональна интенсивности света  $I_0$ . Существуют установки, позволяющие, например, измерять *спектры действия фотосинтеза по скорости выделения кислорода*. Один из методов заключается в том, что интенсивность света устанавливается автоматически в режиме, когда регистрируемое полярографически количество выделяющегося кислорода одинаково при всех  $\lambda$ . В этом случае регистрируется величина, обратная интенсивности падающего света ( $1/I_0$ ), и спектр действия представляет собой зависимость  $1/I_0$  от длины волны, т. е.  $1/I_0 = f(\lambda)$ .

## § 9. Методы измерения квантовых выходов флуоресценции

Существуют методы определения абсолютных и относительных квантовых выходов флуоресценции. Измерение *абсолютных квантовых выходов* сопряжено с целым рядом трудностей. Поскольку  $\Phi = n_{\text{фл}}/n_{\text{погл}}$ , необходимо сравнивать число поглощенных квантов

мономатического света с числом квантов полихроматического излучения флуоресценции, которое распределяется в пространстве во всех направлениях. По этой причине при регистрации флуоресценции на детектор попадет лишь некоторая доля светового потока при данной длине волны. Таким образом, для определения  $\varphi$  необходимо знать абсолютную интенсивность возбуждающего света  $I_0$  и константу, связанную с конкретным геометрическим расположением образца и оптических узлов экспериментальной установки, которая влияет на регистрируемую интенсивность флуоресценции  $I_f$ .

Предложенный впервые С. И. Вавиловым прямой метод заключался в том, что сопоставлялась интенсивность флуоресценции, испускаемой с передней стенки образца, с интенсивностью возбуждающего света, рассеянного полностью от чистой матовой поверхности. При этом учитывали изменения чувствительности приемника излучения для разных длин волн, а образцы помещали в интегрирующую сферу. Позднее принцип этого метода был развит в целой серии работ, в которых флуоресценция и рассеянный возбуждающий свет трансформировались в излучение специальным флуоресцирующим экраном (например, родамином В) с одинаковой эффективностью и затем регистрировались детектором. При этом вместо белой матовой поверхности для рассеивания возбуждающего света применяли разбавленные растворы белка. Недостаток этого метода заключается в том, что раствор белка может не обладать идеальными рассеивающими свойствами.

Для практических целей обычно используют измерения не абсолютных, а *относительных квантовых выходов* флуоресценции. При этом сравнивают квантовые выходы исследуемых образцов и стандартных веществ с известным значением  $\varphi$ . Абсолютные квантовые выходы флуоресценции многих веществ определены с необходимой точностью, поэтому эти вещества обычно и применяют в качестве стандартов для вычисления значений  $\varphi$  для других соединений. Измерения проводят на обычных спектрофлуорометрах с использованием низких концентраций исследуемых веществ (разбавленных растворов,  $D \leq 0,02$ ), чтобы избежать эффектов экранирования и реабсорбции флуоресценции.

Интенсивность флуоресценции  $I_f$  (квант/с) пропорциональна интенсивности возбуждающего света  $I_0$  (квант/с), поглощению  $(1 - T)$  и квантовому выходу  $\varphi$ ; при малых  $D$   $I_f \approx 2,303 I_0 \epsilon c l \varphi$ . Тогда если обозначить через  $\varphi$  квантовый выход стандартного соединения, а через  $\varphi_x$  — определяемый квантовый выход исследуемого вещества, то при измерении относительной интенсивности флуоресценции опытного  $I_x$  и контрольного  $I$  образцов в одинаковых условиях (та же кювета, одинаковое геометрическое расположение)

$$\frac{I}{I_x} = \frac{2,303 I_0 \epsilon_1 c_1 l \varphi}{2,303 I_0 \epsilon_2 c_2 l \varphi_x} = \frac{\epsilon_1 c_1 \varphi}{\epsilon_2 c_2 \varphi_x} \quad \text{или} \quad \varphi_x = \frac{\epsilon_1 c_1 I_x}{\epsilon_2 c_2 I} \varphi.$$

При подборе концентрации таким образом, что  $\epsilon_1 c_1 = \epsilon_2 c_2$ , получим  $\varphi_x = (I_x/I) \varphi$ .

Поскольку полному числу испускаемых квантов  $I$  и  $I_x$  пропорциональны площади под кривыми истинных спектров флуоресценции, необходимо экспериментально измеренные спектры флуоресценции, зарегистрированные при одинаковых условиях, исправить с учетом спектральной чувствительности установки. Методы расчета истинных спектров флуоресценции по экспериментальным кривым были обсуждены в предыдущем разделе.

Таким образом, определение квантового выхода флуоресценции исследуемого образца  $\varphi_x$  по известному значению  $\varphi$  стандартного соединения сводится к вычислению соотношения между площадями под кривыми истинных спектров флуоресценции опытного и контрольного образцов. Квантовые выходы стандартных флуоресцирующих веществ в разных растворителях могут быть взяты из соответствующих таблиц. Наиболее высокие значения  $\varphi$  имеют такие соединения, как флуоресцеин (0,79—0,92, в щелочном растворе), перилен (0,87—0,98) и 9,10-дифенилантрацен (0,76—1,0). Хлорофилл  $a$  в эфире ( $\lambda_b = 644$  нм) имеет квантовый выход около 0,3, а хлорофилл  $b$  в тех же условиях — около 0,1.

При измерениях квантовых выходов указанными выше способами необходимо избегать ошибок вследствие немонахроматичности возбуждающего света, флуоресценции кювет, эффектов экранирования и реабсорбции, фотохимических процессов, тушения кислородом и т. п.

Одним из методов определения квантовых выходов является также метод, основанный на измерении *времени жизни* (или скорости затухания флуоресценции). Такой способ измерения  $\varphi$  относится к разряду *динамических методов*, которые будут рассмотрены в последующих разделах. Сейчас необходимо лишь указать, что время жизни определяется из экспоненциальной кривой затухания флуоресценции, возникающей в ответ на импульсное возбуждение исследуемого объекта короткой лазерной вспышкой ( $< 1$  нс). Определив время жизни флуоресценции  $\tau_f$  и зная радиационное время жизни  $\tau_R$ , которое можно вычислить из спектров поглощения ( $1/\tau_R = = 2900 n^2 \tilde{\nu}_0^2 \int \epsilon d\tilde{\nu}$ ), рассчитывают квантовый выход флуоресценции:  $\varphi_f = \tau_f/\tau_R$ .

Как уже обсуждалось ранее, относительный квантовый выход для индивидуальных веществ в стоксовой области постоянен при всех длинах волн. Однако в случае сложной системы, когда флуоресцирует только часть поглощающих свет компонентов, квантовый выход уже будет не постоянным, а зависимым от длины волны возбуждающего света. Измерение такой зависимости может дать информацию о миграции энергии в многокомпонентной системе. Так, в простой двухкомпонентной системе (смесь веществ  $I$  и  $II$ ), в которой флуоресцирует только один компонент  $II$ , выход флуоресценции окажется пропорциональным доле поглощения вещества  $II$  в общем по-

глощении. Очевидно, что квантовый выход чистого вещества  $I$  (система однокомпонентна) не зависит от длины волны возбуждающего света. Однако в смеси (двухкомпонентная система) при отсутствии миграции энергии с компонента  $I$  на компонент  $II$  квантовый выход флуоресцирующего вещества  $II$  ( $\phi_{II}$ ) будет падать в области поглощения вещества  $I$  (экранирующий эффект). В случае полной (100%-ной) миграции энергии с компонента  $I$  на компонент  $II$  квантовый выход  $\phi_{II}$  окажется постоянным в области поглощения обоих веществ. Во всех промежуточных ситуациях (частичная миграция энергии)  $\phi_{II}$  будет всегда уменьшаться при переходе в область поглощения компонента  $I$ .

## § 10. Поляризация флуоресценции и методы ее измерения

Измерение поляризованной (анизотропной) флуоресценции дает информацию о размерах, конформации, внутренней подвижности макромолекул, о миграции энергии возбуждения между различными компонентами сложных систем и об ориентации их дипольных моментов электронных переходов.

При возбуждении свет поглощается молекулами, которые оказываются определенным образом ориентированными по отношению к электрическому вектору световой волны. Поскольку излучение испускается с наиболее низкого возбужденного электронного уровня даже в том случае, когда возбуждение происходит на более высокие энергетические уровни молекулы (более коротковолновые полосы поглощения в спектре), осцилляторы во флуоресценции и поглощении будут различаться не только частотой, но и ориентацией относительно скелета молекулы. Иными словами, после поглощения энергия излучается в результате другого электронного перехода со своим направлением дипольного перехода.

Только в том случае, когда поглощение происходит на самый нижний возбужденный уровень, испускание будет представлять собой точное обращение процесса поглощения. Переходный момент молекулы будет находиться в плоскости колебаний испускаемого света. При этом направление распространения флуоресценции хотя и не обязательно должно быть перпендикулярным моменту перехода, однако является наиболее вероятным. Существенно подчеркнуть, что если время жизни возбужденного состояния оказывается большим по сравнению с временем, необходимым для переориентации молекулы (т. е. за время возбужденного состояния ориентация молекул или хромофоров становится хаотической), то флуоресценция будет полностью деполаризована.

Однако в реальных случаях для большинства макромолекул переориентация происходит не так быстро и за время жизни возбужденного состояния ориентация не успевает стать хаотической. Более того, в некоторых случаях молекулы могут оказаться достаточно жестко фиксированными и даже ориентированными одинаково

вым образом, подобно полимерным молекулам в пленках.

При исследовании флуоресценции растворов сложных органических молекул (красителей) обнаружено, что излучение всегда частично поляризовано, хотя в таких системах молекулы флуоресцирующего вещества распределены в среде хаотически. Анизотропия в распределении излучающих молекул в этом случае создается самим возбуждающим светом, поскольку вероятность возбуждения молекулы определяется углом  $\theta$  между осью осциллятора (моментом

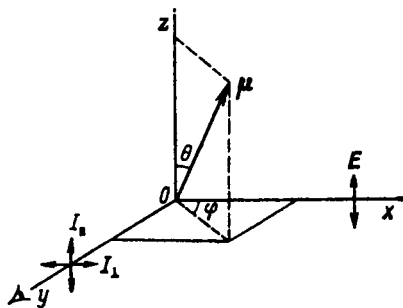


Рис. 17. Поляризация флуоресценции. Возбуждающий свет плоскополяризован и распространяется вдоль оси  $Ox$ ; свет флуоресценции распространяется вдоль оси  $Oy$  (остальные объяснения см. в тексте)

перехода) поглощения и направлением электрического вектора падающего на объект света. Амплитуду электрического вектора  $E$  можно разложить на две взаимно перпендикулярные составляющие: параллельную и перпендикулярную оси осциллятора молекулы. Очевидно, что действующая амплитуда окажется тогда равной  $E \cos \theta$ , а интенсивность —  $E^2 \cos^2 \theta$ . Таким образом, вероятность поглощения для данной ориентации, определяемой углом  $\theta$ , окажется пропорциональной  $\cos^2 \theta$ . Это означает, что главным образом будут возбуждаться те молекулы, момент перехода которых параллелен вектору  $E$  (рис. 17).

Рассмотрим вначале *жесткую изотропную систему*, когда флуоресцирующие молекулы или хромофоры расположены хаотически и за характерные времена флуоресценции переориентация молекул не происходит. Такими системами могут быть, например, замороженные растворы молекул или жестко связанные с относительно большими молекулами хромофоры. Пусть излучению и поглощению соответствует один и тот же электронный переход в молекуле ( $S_0 \rightarrow S_1^i$ ,  $S_1^i \rightarrow S_0 + h\nu$ ), тогда угол между моментами переходов поглощения и излучения равен нулю ( $\alpha = 0$ , моменты переходов параллельны). Если такую систему освещать плоскополяризованным светом, распространяющимся вдоль оси  $Ox$ , электрический вектор которого лежит в плоскости (рис. 17)  $xOz$ , то флуоресценция, распространяющаяся вдоль оси  $Oy$ , будет поляризована вследствие анизотропии распределения возбужденных молекул (вероятность пропорциональна  $\cos^2 \theta$ ) с цилиндрической симметрией относительно оси  $z$ .

Поскольку анизотропия возбужденных молекул в течение всего времени возбужденного состояния сохраняется (жесткая система), испускаемая флуоресценция также анизотропна и можно определить *степень поляризации флуоресценции  $P$* .

Если измерять интенсивность флуоресценции, излучаемую по оси  $y$ , то компонент  $F_{\parallel}$ , поляризованный параллельно поляризации возбуждающего света (вдоль оси  $z$ ), будет больше компонентом с перпендикулярной поляризацией (вдоль оси  $x$ )  $F_{\perp}$ . Отсюда следует, что степень поляризации  $P$  удобно представить как разницу  $(F_{\parallel} - F_{\perp})$ , деленную на сумму  $(F_{\parallel} + F_{\perp})$ , т. е.  $P = (F_{\parallel} - F_{\perp}) / (F_{\parallel} + F_{\perp})$ . Можно показать, что суммарный полный свет флуоресценции пропорционален  $(F_{\parallel} + 2F_{\perp})$ , т. е. суммарное излучение содержит вдвое больше перпендикулярных составляющих, поэтому разницу  $(F_{\parallel} - F_{\perp})$  можно нормировать и на величину  $(F_{\parallel} + 2F_{\perp})$ . Такое соотношение называется *степенью анизотропии* ( $A$ ):  $A = (F_{\parallel} - F_{\perp}) / (F_{\parallel} + 2F_{\perp})$ . Величину  $A$  часто используют при анализе поляризационных характеристик сложных систем. Иногда для оценки ориентации дипольных моментов переходов применяют так называемое *поляризационное отношение*  $PF = F_{\parallel} / F_{\perp}$ .

Степени поляризации и анизотропии флуоресценции связаны друг с другом следующими соотношениями:  $P = 3A / (2 + A)$ ;  $A = 2P / (3 - P)$ .

Для вычисления компонент  $F_{\parallel}$  и  $F_{\perp}$  поляризованной флуоресценции для описанной выше системы (рис. 17) необходимо умножить вероятность излучения  $W_j$  на долю возбужденных молекул с заданной ориентацией дипольных моментов переходов  $g_A$  и произвести усреднение по всем ориентациям (углам  $\theta$  и  $\varphi$ ). Относительное число молекул с  $\mu$ , ориентированным в интервале углов  $d\theta$  и  $d\varphi$  до возбуждения, пропорционально  $\sin \theta d\theta d\varphi$ , где множитель  $\sin \theta$  отражает большую вероятность встретить молекулы с преимущественно перпендикулярной ориентацией по отношению к ориентации электрического вектора  $E$ , параллельного оси  $z$ . С другой стороны, вероятность возбуждения ориентированной молекулы пропорциональна  $\cos^2 \theta$ . Таким образом, относительное количество возбужденных молекул будет пропорционально  $K = \sin \theta \cos^2 \theta d\theta d\varphi$ . Общее число возбужденных молекул будет равно

$$\int_0^{2\pi} d\varphi \int_0^{\pi} \sin \theta \cos^2 \theta d\theta,$$

тогда как относительное число ориентированных в интервале углов  $d\theta$  и  $d\varphi$  возбужденных молекул есть  $K(\theta, \varphi)$ .

Отсюда доля возбужденных молекул с заданной ориентацией выразится соотношением

$$g_A(\theta, \varphi) = \frac{K(\theta, \varphi)}{\int_0^{2\pi} d\varphi \int_0^{\pi} \sin \theta \cos^2 \theta d\theta} = \frac{3}{4} \pi \sin \theta \cos^2 \theta d\theta d\varphi.$$

Вероятность испускания компонента поляризованной флуоресценции с параллельной электрическому вектору возбуждающего света (оси  $z$ ) ориентацией момента перехода  $W_{j\parallel}$  пропорциональна



$\cos^2\theta$ , в то время как для компонента с перпендикулярной ориентацией  $W_{f\perp}$  — пропорциональна  $\sin^2\theta \cos^2\varphi$ , поскольку вероятности определяются величинами  $|\mu K_z|^2$  или  $|\mu K_x|^2$ , где  $K_z$  и  $K_x$  — единичные векторы вдоль оси  $z$  и  $x$  соответственно. Относительные интенсивности компонентов поляризованной флуоресценции  $F_{\parallel}$  и  $F_{\perp}$ , очевидно, будут равны  $F_{\parallel} = W_{f\parallel}(\theta) g_A(\theta, \varphi)$  и  $F_{\perp} = W_{f\perp}(\theta, \varphi) g_A(\theta, \varphi)$ , откуда

$$F_{\parallel} = \frac{3}{4} \pi \sin\theta \cos^2\theta \cos^2\theta d\theta d\varphi = \frac{3}{4} \pi \sin\theta \cos^4\theta d\theta d\varphi;$$

$$F_{\perp} = \frac{3}{4} \pi \sin\theta \cos^2\theta \sin^2\theta \cos^2\varphi d\theta d\varphi = \frac{3}{4} \pi \sin^3\theta \times \\ \times \cos^2\theta \cos^2\varphi d\theta d\varphi.$$

После интегрирования по всем углам  $\theta$  и  $\varphi$

$$F_{\parallel} = \frac{3}{4} \pi \int_0^{\pi} \sin\theta \cos^4\theta d\theta \int_0^{2\pi} d\varphi = \frac{3}{5};$$

$$F_{\perp} = \frac{3}{4} \pi \int_0^{\pi} \sin^3\theta \cos^2\theta d\theta \int_0^{2\pi} \cos^2\varphi d\varphi = \frac{1}{5}.$$

Таким образом, при возбуждении поляризованным вдоль оси  $z$  возбуждающим светом ( $E$  параллельно оси  $z$ ) жесткой системы с хаотической ориентацией осцилляторов в условиях, когда направления моментов переходов поглощения и излучения совпадают, испускается частично поляризованная флуоресценция и степень поляризации оказывается равной  $1/2$ . Это значение степени поляризации называется *предельным*, поскольку оно получено для жесткой среды, когда поворот молекулы за характерное время жизни флуоресценции невозможен. Предельное значение степени анизотропии для рассмотренной ситуации легко вычислить, воспользовавшись соотношением  $A = 2P/(3 - P) = 2/5$ . Предельные значения степени поляризации и анизотропии, обозначаемые часто как  $P_0$  и  $A_0$  соответственно, зависят от угла  $\alpha$  между моментами перехода поглощения и флуоресценции. Для вертикально поляризованного возбуждающего света

$$P_0 = (3 \cos^2\alpha - 1)/(\cos^2\alpha + 3) \text{ и } A_0 = (3 \cos^2\alpha - 1)/5.$$

Отсюда следует, что если угол между осцилляторами составляет  $\pi/2$ , то  $P_0 = -1/3$  и  $A_0 = -1/5$ . Такие ситуации часто реализуются для плоских хромофоров, когда при поглощении молекула переходит на второй (энергетически более высокий) возбужденный уровень  $S_2^*$  с последующим излучением с первого возбужденного уровня  $S_1^*$ . Из рис. 18 видно, что предельные значения степени поляризации возрастают от  $-0,33$  до  $+0,5$  при изменении

$\alpha$  от  $\pi/2$  до 0. В более общем случае угол  $\alpha$  будет иметь различные значения для разных электронных переходов и, следовательно,  $P_0$  зависит от  $\lambda$  возбуждающего света.

Такие поляризационные спектры в принципе позволяют разрешить перекрывающиеся полосы, соответствующие различным электронным переходам. Уравнение, описывающее взаимосвязь  $P_0$  и  $\alpha$ , дает возможность определить ориентацию осцилляторов различных полос поглощения по отношению к флуоресцирующему осциллятору. Однако в реальных ситуациях поляризационные спектры флуоресценции достаточно сложны не только из-за перекрывания нескольких полос поглощения, но и потому, что в случае даже простых переходов с основного уровня на первый синглетный и обратно величина  $P_0$  может варьировать для разных компонентов колебательной структуры полосы флуоресценции. Это означает, что поляризация флуоресценции при неизменной длине волны возбуждения может зависеть от длины волны самой флуоресценции.

Представленные выше соотношения для определения предельных значений степени поляризации и анизотропии были выведены для случая, когда флуоресценция возбуждалась линейно поляризованным светом. Однако флуоресценция оказывается частично поляризованной и в том случае, если возбуждение производится естественным (неполяризованным) светом. При этом анизотропия флуоресцирующих молекул создается падающим светом, который будет преимущественно возбуждать те молекулы, моменты переходов которых расположены под небольшим углом к плоскости, перпендикулярной к направлению распространения возбуждающего света (плоскость  $zOy$ ; см. рис. 17). Предельная степень поляризации при возбуждении естественным светом  $P_n$  связана с предельным значением поляризации при возбуждении поляризованным светом соотношением

$$P_n = P_0 / (2 - P_0).$$

Если измеряемые образцы имеют слабую флуоресценцию, которая, однако, сильно поляризована, то использование естественного света при возбуждении имеет большой практический смысл, поскольку позволяет существенно (более чем в два раза) увеличить интенсивность возбуждения и флуоресценции.

В случае возбуждения естественным светом неподвижных неориентированных молекул предельная степень поляризации также связана с углом между моментами перехода поглощающих и флуоресцирующих диполей:

$$P_n = (3 \cos^2 \alpha - 1) / (7 - \cos^2 \alpha).$$

При изменении  $\alpha$  от 0 до  $\pi/2$  величина  $P_n$  варьирует в пределах от  $1/3$  до  $-1/7$  (рис. 19). Если  $\alpha = 55^\circ$ , то  $P_n = P_0 = 0$ , т. е.  $F_{\parallel} = F_{\perp}$ . Предельные значения степени поляризации, которые вычислены из предположения о полной анизотропии осцилляторов

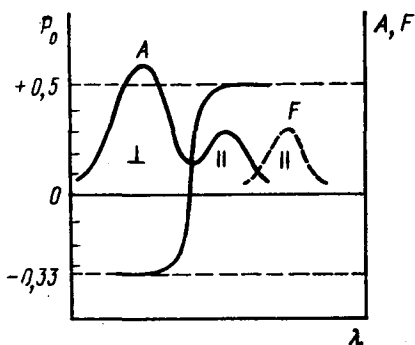


Рис. 18. Спектры поглощения ( $A$ ), флуоресценции ( $F$ ) и возбуждения поляризации флуоресценции ( $P_0$ ) гипотетического вещества с двумя взаимно перпендикулярно ориентированными полосами поглощения

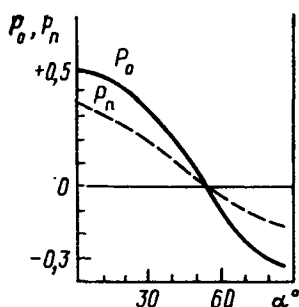


Рис. 19. Зависимость предельных значений степени поляризации флуоресценции при возбуждении вертикально поляризованным ( $P_0$ ) и неполяризованным ( $P_n$ ) светом от угла  $\alpha$  между поглощающим и флуоресцирующим осцилляторами

и жесткой фиксации молекул в среде, практически никогда не наблюдаются. Например, вместо величины  $P_0 = 0,5$  ( $\alpha = 0$ , возбуждение плоскополяризованным светом) регистрируемое значение лежит в пределах  $0,40-0,45$ . Такие различия между теоретической и экспериментально определяемой величиной  $P$  связаны с неполной анизотропией самых осцилляторов поглощения и флуоресценции и их нежесткой фиксацией относительно скелета молекулы. Предельное значение степени поляризации может быть использовано для получения информации о симметрии молекулы.

Как было показано выше,  $P_0$  достигает значения  $1/2$  в условиях полной анизотропии осцилляторов, которые совпадают по направлению. Однако подобная модельная система оказывается применимой только к случаю, когда молекулы обладают достаточно низкой симметрией. Если рассмотреть молекулы с плоским строением, которые обладают высокой симметрией (например, молекула бензола), то оказывается невозможным выделить преимущественное направление осцилляторов поглощения или испускания, а необходимо учесть сразу несколько равновероятных направлений для осциллятора в плоскости молекулы. Процессы поглощения и испускания в данной ситуации необходимо моделировать уже так называемым «плоским осциллятором», который будет характеризоваться составляющими, расположенными в плоскости молекулы и имеющими одинаковую величину и разное направление. При этом перпендикулярная плоскости молекулы составляющая в первом приближении оказывается равной нулю (плоские осцилляторы характеризуют молекулы с вырожденными электронными состояниями). В соответствии с теоретическими расчетами предельное значение степени

поляризации у высокосимметричных молекул оказывается существенно меньше, чем у несимметричных. Показано, что если молекула имеет симметрию выше второго порядка ( $n > 2$ ), то степень поляризации  $R \leq 1/7$  (случай плоского осциллятора); если  $n \leq 2$  (симметрия второго порядка или ниже), то  $P \leq 1/2$ .

С помощью метода измерения степени поляризации исследована симметрия молекул порфиринов. Оказалось, что  $P$  не остается постоянной в спектре флуоресценции, а изменяется довольно значительно при переходе от одной полосы флуоресценции к другой. Предельное значение для тетрафенилпорфина в этих экспериментах составило около 0,4. Это означает, что симметрия такой молекулы не выше второго порядка.

Аналогичные результаты удалось получить и для молекул пропорфина и мезопорфина. Для фталоцианина магния предельное значение степени поляризации не превышало  $1/7$ . Эти данные позволили прийти к выводу, что молекула фталоцианина магния имеет симметрию четвертого порядка и четыре пиррольных кольца, определяющие структуру молекулы, полностью эквивалентны, а симметрично расположенные химические связи равноправны. Теоретическое значение  $P = 1/7$  будет получаться, если осцилляторы поглощения и флуоресценции расположены в плоскости молекулы. Действительно, длинноволновый осциллятор поглощения у молекул указанного выше типа лежит в плоскости молекулы.

При изучении дихроизма пленок хлорофилла также оказалось, что момент перехода длинноволновой (красной) полосы поглощения расположен в плоскости молекулы. Однако значение степени поляризации составляло около 0,42, что характерно для несимметричных молекул. По всей вероятности, симметрия у хлорофилла по сравнению с фталоцианином магния частично нарушается вследствие гидрирования одного из пиррольных колец.

Изучение спектра поляризованной флуоресценции, т. е. зависимости степени поляризации от длины волны флуоресценции  $P = f(\lambda_{фл})$ , позволяет исследовать природу полос излучения молекулы и влияние колебаний на поляризационные свойства. Для порфиринов, например, величина  $P$  зависела от длины волны флуоресценции, причем в коротковолновой полосе степень поляризации составляла около 0,40 (значение характерно для сложных молекул в вязкой среде), тогда как в длинноволновой полосе — около 0,15. В данном случае каждой полосе флуоресценции соответствовала своя величина  $P$ .

Для сложных молекул с одной полосой испускания величина  $P$  монотонно изменяется в пределах полосы испускания (приблизительно на 5—10 %). Это означает, что для порфиринов (например, для тетрафенилпорфина или протопорфина) зависимость  $P = f(\lambda_{фл})$  отличается от аналогичной зависимости у сложных молекул. Изучение зависимости степени поляризации от длины волны возбуждающего света  $P = f(\lambda_{в})$  (спектра возбуждения поляризован-

ной флуоресценции) и их сопоставление со спектрами поглощения молекулы позволяют получить информацию о процессах поглощения и излучения, о взаимной ориентации моментов переходов в поглощении и флуоресценции. Так, для хлорофилла в касторовом масле в области длинноволновой полосы поглощения при 660 нм величина  $P$  максимальна, а в области синей полосы при 430 нм — минимальна. Таким образом, в каждой полосе поглощения наблюдается свое значение степени поляризации, которое практически постоянно в пределах соответствующей полосы.

Измерение степени поляризации имеет большое значение для установления факта миграции энергии возбуждения между различными компонентами системы или между молекулами одного и того же вещества при увеличении его концентрации. Согласно теории диполь-дипольного переноса энергии, эффективность процесса зависит от расстояния (в шестой степени по Ферстеру —  $R^6$ ) между донором и акцептором энергии и от взаимной ориентации их дипольных моментов переходов  $\mu_D$  и  $\mu_A$ .

Критическое расстояние миграции для флуоресценции, например, около 5,0 нм, а для хлорофилла — около 8,0 нм. Наиболее эффективен перенос энергии в случае, когда  $\mu_D$  параллелен  $\mu_A$  (т. е.  $\alpha = 0$ ), однако миграция, хотя и с меньшей эффективностью, будет идти, если строгая параллельность между  $\mu_D$  и  $\mu_A$  не соблюдается. Очевидно, что следствием миграции энергии будет деполяризация флуоресценции, которая наблюдается, например, при увеличении концентрации флуоресцирующих молекул и их сближении. Передача энергии возбуждения от одной молекулы к другой приведет к потере первоначальной анизотропии распределения возбужденных молекул и, следовательно, к деполяризации флуоресценции. В соответствии с уравнением Вебера

$$\frac{1}{P} \pm \frac{1}{3} = \left( \frac{1}{P_0} \pm \frac{1}{3} \right) \left( 1 + \frac{4\pi N_A R^6 10^3}{15d^3} c \right),$$

где  $P_0$  — степень предельной поляризации (значение  $P$  в отсутствие деполяризации);  $R$  — критическое расстояние между параллельными диполями, на котором вероятности миграции и испускания энергии равны;  $d$  — диаметр молекулы,  $c$  — концентрация, моль/л;  $N_A$  — число Авогадро; знак «+» соответствует возбуждению естественным светом, а знак «−» — вертикально поляризованным. Показано, что в растворах хлорофилла концентрационная деполяризация наблюдается уже при концентрациях около  $10^{-4}$  г/см<sup>3</sup>, а у растворов порфиринов — при  $10^{-3}$  г/см<sup>3</sup>.

Миграцию энергии исследуют методом поляризации флуоресценции в условиях, когда практически исключено влияние других факторов, уменьшающих степень поляризации (в вязких средах, при низких температурах и т.п.).

Ранее предположали, что за времена жизни порядка  $10^{-9}$  —  $10^{-8}$  с молекулы не успевают изменить своей ориентации (жест-

кая система). Однако если вязкость среды мала, то еще до акта испускания анизотропия возбужденных молекул будет утрачена и установится случайное распределение ориентаций, что приведет к деполаризации флуоресценции. Таким образом, степень поляризации  $P$  определяется как углом между осями поглощающего и флуоресцирующего осциллятора, так и поворотом молекулы за время жизни флуоресценции  $\tau$ , который зависит от условий среды (температуры, вязкости) и особенностей строения самой молекулы (размеров, формы, асимметрии, сольватации и т. п.). При определенных соотношениях между  $\tau$  и периодом поворота молекулы вокруг своей оси степень поляризации будет изменяться от максимального значения до нуля.

Средний период вращения, называемый *временем вращательной релаксации*  $\rho$ , связан с молярным объемом ( $V$ ), коэффициентом вязкости среды ( $\eta$ ) и температурой следующим соотношением:  $\rho = 3V\eta/RT$ . Это соотношение выведено из предположения о сферической форме молекулы.

В соответствии с уравнением Левшина:

$$1/P_0 - 1/3 = [1 - (3/2) \sin^2 \beta] (1/P - 1/3),$$

где  $P_0$  — предельное значение степени поляризации,  $P$  — измеряемая степень поляризации в эксперименте при устранении всех деполаризующих факторов,  $\beta$  — средний угол поворота молекулы за время возбужденного состояния ( $\tau$ ). Показано, что  $\sin^2 \beta = (2/3) RT \tau / (V\eta + RT\tau)$ , откуда нетрудно получить соотношение

$$\frac{1}{P} = \frac{1}{P_0} + \left( \frac{1}{P_0} - \frac{1}{3} \right) \frac{RT\tau}{V\eta}.$$

Эту формулу используют при изучении свойств различных молекул (объема, симметрии), микро- и макровязкости, а также времени жизни возбужденного состояния. Для экспериментальных определений молекулярного объема сферических частиц используют зависимость  $1/P$  от  $T/\eta$ , которая в соответствии с последним уравнением линейна.

При исследовании биополимеров их молекулы обычно аппроксимируют эллипсоидами вращения и время релаксации  $\rho_{эл}$  при этом вычисляют из времен релаксации, соответствующих вращению молекулы вокруг осей эллипсоида. Оценку асимметрии макромолекул и формы биополимеров производят из соотношения времени релаксации  $\rho_{эл}$  и  $\rho_0$ , где  $\rho_0$  соответствует сферической частице того же объема, что и частица, аппроксимированная эллипсоидом вращения с известным соотношением осей  $L_1/L_2$ . Затем строят зависимость величины  $\rho_{эл}/\rho_0$  от  $L_1/L_2$ , которая представлена на рис. 20.

Методы поляризационной спектродиффуориметрии нашли широкое применение при изучении особенностей ориентации различных компонентов фотосинтетических мембран *in vivo*. В частности, ис-

следование спектров поляризованной флуоресценции хлоропластов высших растений и зеленых водорослей позволило в ряде случаев установить ориентацию моментов переходов по отношению к плоскости фотосинтетической мембраны для различных излучающих центров (форм) хлорофилла *a*. Спектры поляризованной флуоресценции при этом измеряли для объектов (хлоропластов, одноклеточных водорослей), предварительно ориентированных в постоянном магнитном поле или в полиакриламидном геле при его деформации. Существенно подчеркнуть, что ориентация мембран оставалась фиксированной в процессе измерения спектров, чего достигали постоянным наложением магнитного поля, низкими температурами (вплоть до 77 К) или использованием полиакриламидного геля.

Рассмотрим излучение фотосинтетических мембран, ориентированных, например, в магнитном поле. Обычно такие мембраны для хлоропластов и клеток хлореллы ориентируются перпендикулярно магнитным силовым линиям. Пусть мембраны идеально ориентированы параллельно плоскости  $xOz$ , т. е. направление оси  $y$  совпадает с направлением магнитных силовых линий (рис. 21).

Ограничимся рассмотрением излучения одного флуоресцирующего центра (формы) пигмента. Сделаем предположение, что дипольные моменты  $\mu_i$  излучающих электронных переходов ориентированы одинаковым образом по отношению к плоскости мембраны, образуя угол  $\beta$  с нормалью к этой плоскости  $xOz$ . Векторы моментов переходов можно считать равномерно распределенными в пространстве

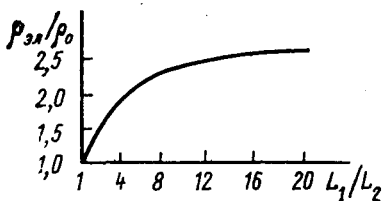


Рис. 20. Теоретическая зависимость  $\rho_{\text{пол}}/\rho_0$  от  $L_1/L_2$  (объяснение см. в тексте)

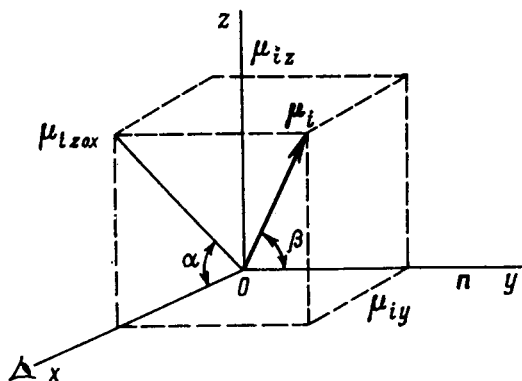


Рис. 21. Поляризация флуоресценции ориентированных фотосинтетических мембран

вокруг оси  $y$  и образующими конус с вершиной в точке  $O$  (начало координат) и углом  $2\beta$  при вершине. Интенсивность излучения  $F_i$  некоторого  $i$ -го момента перехода  $\mu_i$ , направленного вдоль оси  $x$  (ось наблюдения флуоресценции), поляризованного в плоскости, параллельной плоскости ориентации мембран  $xOz$  и перпендикулярной ей  $xOy$ , будет определяться произведением некоторого постоянного множителя  $a$ , зависящего от условий измерения, на квадрат проекции вектора  $\mu$  на соответствующие оси  $Oz$  и  $Oy$  ( $\mu_{iz}$  и  $\mu_{iy}$ ):

$$F_{i\parallel} = a\mu_{iz}^2 \text{ и } F_{i\perp} = a\mu_{iy}^2,$$

где  $F_{i\parallel}$  и  $F_{i\perp}$  — компоненты излучения  $i$ -го перехода, поляризованные параллельно и перпендикулярно плоскости мембраны  $xOz$ .

В свою очередь, соответствующие проекции момента перехода определяются величиной вектора  $\mu$  с учетом угла  $\beta$  между  $\mu$  и нормалью к плоскости  $xOz$  и угла  $\alpha$ , образованного проекцией  $\mu$  на плоскость  $xOz$  и осью  $x$ :  $\mu_{iz}^2 = \mu^2 \sin^2 \beta \sin^2 \alpha$ ;  $\mu_{iy}^2 = \mu^2 \cos^2 \beta$ . Таким образом,

$$F_{i\parallel} = a\mu^2 \sin^2 \beta \sin^2 \alpha;$$

$$F_{i\perp} = a\mu^2 \cos^2 \beta.$$

При усреднении по всем углам  $\alpha$  получается

$$\langle F_{i\parallel} \rangle = (a\mu^2/2) \sin^2 \beta; \quad \langle F_{i\perp} \rangle = a\mu^2 \cos^2 \beta.$$

Опустив знак усреднения  $\langle \rangle$ , поскольку в дальнейшем операции производят только с величинами  $\langle F_{i\parallel} \rangle$  и  $\langle F_{i\perp} \rangle$ , можно записать, что

$$F_{i\parallel}/F_{i\perp} = PF = (1/2) (\sin^2 \beta / \cos^2 \beta) = (1/2) \operatorname{tg}^2 \beta,$$

где  $PF$  — поляризационное отношение.

Отсюда следует, что величина угла  $\beta$  может быть определена из соотношения  $F_{i\parallel}/F_{i\perp}$ , т. е.  $\beta = \operatorname{arctg} \pm (\sqrt{2PF})$ . Это означает, что при измерении интенсивности флуоресценции, поляризованной параллельно и перпендикулярно плоскости мембраны, можно вычислить угол наклона дипольных моментов перехода излучающих молекул пигмента по отношению к этой плоскости. В общем случае для данного излучающего центра (некоторой молекулы или молекул пигмента) угол  $\beta$  может принимать с определенной вероятностью любое значение от 0 до  $\pi/2$ . В таком случае величина  $PF$  определяет параметры ориентации так называемого *усредненного перехода*, т. е. момента перехода, ориентированного таким образом, что поляризация его излучения или поглощения совпадает с регистрируемой в опыте поляризацией излучения или поглощения всего образца.

Очевидно что в случае хаотической ориентации моментов переходов  $PF = 1$ , т. е.  $F_{i\parallel} = F_{i\perp}$  и  $\beta = \operatorname{arctg} (\pm \sqrt{2}) \approx \pm 54^\circ 40'$ .



Если  $PF > 1$ , то  $\beta > 54^\circ 40'$ , а при  $PF < 1$   $\beta < 54^\circ 40'$ . Так как  $\beta$  — это угол между вектором дипольного момента и нормалью к плоскости мембраны, то при параллельной этой плоскости ориентации  $\mu$  угол  $\beta = \pi/2$ , а при перпендикулярной —  $\beta = 0$ .

Таким образом, величину угла ориентации усредненного момента перехода  $\mu$ , а следовательно, и поляризационное отношение  $PF$  можно использовать в качестве меры упорядоченности таких переходов излучающего центра (молекул) пигмента по отношению к плоскости фотосинтетической мембраны. На практике, кроме величины  $PF$  часто измеряют разность между  $F_{\parallel}$  и  $F_{\perp}$  ( $\Delta F = F_{\parallel} - F_{\perp}$ ).

Очевидно, что

$$\Delta F = a\mu^2 [(1/2) \sin^2 \beta - \cos^2 \beta] = a\mu^2 [(1 - 3 \cos^2 \beta)/2].$$

Поскольку величина  $a\mu^2$  для данного образца постоянна, для описания степени упорядоченности может быть использовано соотношение  $(1 - 3 \cos^2 \beta)/2 = q$ , которое называется *фактором порядка* (или параметром порядка). Если  $(\pi/2) \geq \beta > 54^\circ 40'$ , то  $(1/2) \geq q > 0$ , а при  $\beta < 54^\circ 40'$  величина  $q < 0$ .

Поляризационное отношение и фактор порядка связаны соотношением  $PF = (1 + q)/(1 - q)$ . Преимущество измерения величины  $PF$  для определения степени ориентации моментов переходов состоит в том, что эта величина не зависит от формы полосы флуоресценции. Однако в случае смеси различных молекул, ориентация которых неодинакова, а спектры флуоресценции перекрываются, использовать поляризационное отношение необходимо с осторожностью. С другой стороны, так как форма полосы в спектрах  $\Delta F = f(\lambda)$  повторяет форму соответствующей полосы в спектрах флуоресценции, регистрация таких поляризационных спектров позволяет определить вид спектров флуоресценции ориентированных молекул пигмента.

Приведенное выше рассмотрение сделано исходя из предположения о том, что фотосинтетические мембраны идеальным образом ориентированы. В реальных ситуациях, однако, получить образцы с такой степенью ориентации фотосинтетических мембран не удастся. Основными причинами неполной ориентации фотосинтетических мембран являются нарушение ориентации хлоропластов или клеток водорослей вследствие теплового движения и естественная кривизна нативных мембран. Первая причина может быть частично или полностью устранена применением вязких сред, мощных ориентирующих полей и замораживанием ориентированных объектов. Влияния естественной кривизны мембран избежать невозможно, что предъявляет повышенные требования к выбору объекта исследования и методам приготовления образцов.

Для измерения поляризации флуоресценции в зависимости от степени сложности получаемой информации применяют различные установки — поляризационные флуориметры с фильтрами, с одним

или двумя монохроматорами. Перед регистрирующим свет флуоресценции фотоумножителем (или фотозэлементом) помещается поляроид (поляризационный фильтр), который служит анализатором. За анализатором обычно располагается деполяризатор (поляризационный фильтр), чтобы избежать ошибок при регистрации, возникающих вследствие различной чувствительности фотокатода к вертикально и горизонтально поляризованному свету. Возбуждающий свет, падающий на флуоресцирующий образец, может быть либо неполяризованным, либо плоскополяризованным. В последнем случае возбуждающий флуоресценцию свет проходит через поляроид (поляризатор). Поворачивая анализатор, расположенный за образцом, можно определить максимальное и минимальное значения интенсивности флуоресценции. При повороте анализатора на  $\pi/2$  будут поочередно пропускаться вертикальный и горизонтальный компоненты флуоресценции ( $F_{\parallel}$  и  $F_{\perp}$ ). Поляризация флуоресценции растворов, как правило, измеряется под прямым углом к направлению распространения возбуждающего света, хотя возможно и другое взаиморасположение возбуждающего и флуоресцирующего лучей. На рис. 22 показана схема простейшей установки с фильтрами для выделения необходимых областей возбуждения и излучения, которая может быть использована для измерения поляризации флуоресценции.

В современных приборах возбуждение флуоресценции производится с помощью монохроматора. Анализ этой флуоресценции осуществляется другим монохроматором.

При *статическом методе*, основанном на непосредственном сравнении двух световых потоков, поляризованных во взаимно перпендикулярных плоскостях, достаточно высокая точность может быть достигнута, если степень поляризации флуоресценции объекта сравнительно велика. В случае малых значений степени поляризации используют *дифференциальные (динамические) методы*, позволяющие сразу регистрировать либо разницу между вертикальной и горизонтальной составляющими флуоресценции ( $\Delta F = F_{\parallel} - F_{\perp}$ ), либо степень поляризации  $P = (F_{\parallel} - F_{\perp}) / (F_{\parallel} + F_{\perp})$  или  $\cos^2 \alpha = (2F_{\parallel} - F_{\perp}) / (F_{\parallel} + 2F_{\perp})$ .

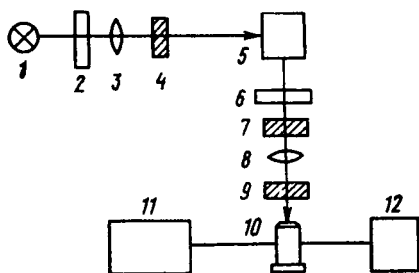


Рис. 22. Схема установки с набором светофильтров для измерения поляризации флуоресценции:

1 — источник возбуждающего света, 2 — светофильтр, 3 — фокусирующая линза, 4 — поляризатор (поляризатор), 5 — кюветное отделение, 6 — светофильтр, 7 — поляризатор (анализатор), 8 — линза, 9 — деполяризатор, 10 — фотоумножитель, 11 — система питания, 12 — система регистрации

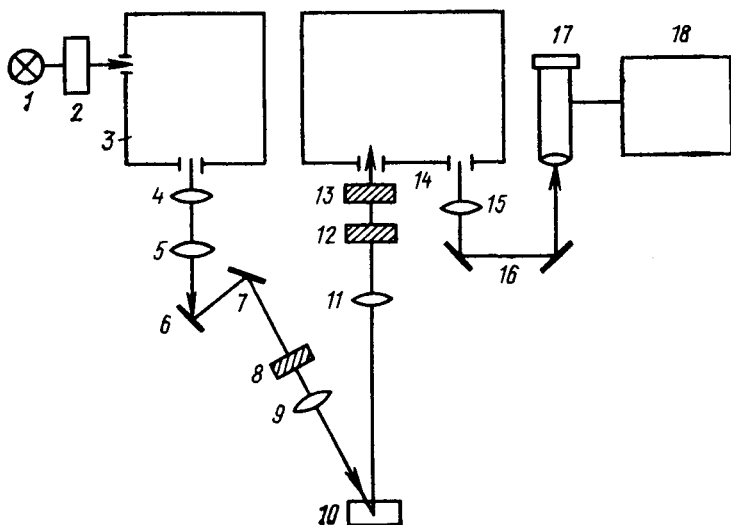


Рис. 23. Схема установки для измерения спектров поляризованной флуоресценции и ее возбуждения (объяснение см. в тексте)

В качестве примера статической регистрации спектров поляризованной флуоресценции и ее возбуждения рассмотрим принципиальную схему установки, которую используют на кафедре биофизики Биологического факультета МГУ для исследования поляризационных характеристик фотосинтетических мембран (рис. 23).

Возбуждающий свет от источника 1 через тепловой фильтр 2 попадает в первый монохроматор 3. Монохроматический свет, проходя через систему линз 4, 5, зеркал 6, 7 и поляризационный фильтр (поляризатор) 8, фокусируется линзой 9 на кювету с ориентированным образцом 10. Свет флуоресценции образца собирается на входной щели монохроматора регистрации (второй монохроматор 14). Перед входной щелью этого монохроматора помещены линза 11 и два поляризационных фильтра: анализатор 12 и деполаризатор 13.

Поворот анализатора на  $90^\circ$  позволяет выделять либо вертикальную, либо горизонтальную составляющую поляризованной флуоресценции. За поляризатором расположен другой поляризационный фильтр (деполяризатор), чтобы избавиться от артефактов, наблюдающихся вследствие избирательной чувствительности флуориметра к поляризации регистрируемого излучения. Деполаризатор 13 установлен таким образом, чтобы его плоскость поляризации составляла угол  $45^\circ$  по отношению к плоскости поляризации света, пропускаемого анализатором 12. Точное положение угла поворота деполаризатора подбирается так, чтобы на неориентированном объекте интенсивность флуоресценции, поляризованной в вертикальной и горизонтальной плоскостях, в любом участке спектра различалась не более чем на 1—2 %.

Выделенное монохроматором регистрации излучение системой линз и зеркал 15, 16 формируется в параллельный пучок и попадает на фотоумножитель 17; затем фототок, пройдя систему детектирования и усиления, поступает на самопишущий потенциометр 18. Установка позволяет регистрировать

спектры поляризованной флуоресценции и ее возбуждения при комнатной и низкой температурах (объект помещается в сосуд Дьюара с жидким азотом).

При динамических методах регистрации степени поляризации флуоресценции принципиальная схема установки практически может не отличаться от описанной выше, только после второго монохроматора помещают призму Рошона и вращающийся диск с отверстиями. Призма Рошона разлагает свет флуоресценции на два поляризованных компонента, а вращающийся диск модулирует оба пучка с различной частотой. В результате оба луча попадают на фотокатод одного фотоумножителя и после усиления сигналы переменного тока разделяются, преобразуются в постоянный ток и получаемые величины напряжения будут пропорциональны  $F_{\parallel}$  и  $F_{\perp}$ . Далее для регистрации и непосредственной записи степени поляризации можно использовать малую аналоговую вычислительную машину.

При другой системе регистрации анализатор равномерно вращается с постоянной частотой  $\omega$ . Расчеты показывают, что в этом случае фототок имеет постоянную составляющую, которая пропорциональна  $(F_{\parallel} + F_{\perp})$ , и переменную составляющую частоты  $2\omega$  с амплитудой, пропорциональной  $(F_{\parallel} - F_{\perp})$ . Измерение степени поляризации флуоресценции, таким образом, сводится к измерению глубины модуляции фототока, т. е. к регистрации соотношения амплитуд между переменной (синусоидальной) и постоянной составляющими. Существуют и другие вариации дифференциальных методов измерения поляризованной флуоресценции.

## § 11. Фосфоресценция и методы ее измерения

Одним из путей безызлучательной дезактивации возбужденной молекулы является интеркомбинационная конверсия  $k_{ic}$  в триплетное состояние. Поскольку нижний колебательный подуровень первого (нижнего) триплетного состояния  $T_1$  находится несколько ниже самого низкого подуровня первого синглетного возбужденного состояния  $S_1$ , более высокие колебательные подуровни для  $T_1$  могут оказаться на одном уровне с этим колебательным подуровнем  $S_1$ . Интеркомбинационная конверсия как раз и происходит вследствие перехода с нижнего подуровня  $S_1$  на высокий колебательный подуровень  $T_1$ .

Если в соответствии с принципом Франка — Кондона представить электронно-возбужденные состояния молекул, способных переходить в триплет, в виде потенциальных кривых, то очевидно, что кривые для  $S_1$  и  $T_1$  должны пересекаться в некоторой точке  $M$  (рис. 24). При поглощении света молекула переходит из основного состояния  $S_0$  в первое электронно-возбужденное состояние  $S_1$ . Молекула быстро теряет избыток колебательной энергии, что соответствует движению изображающей точки вдоль потенциальной

кривой  $S_1$  до точки  $M$ . В точке  $M$  положения и импульсы ядер для возбужденного синглетного уровня и первого триплетного уровня  $T_1$  оказываются одинаковыми. Это означает, что молекула в точке  $M$  может перейти на соответствующий подуровень триплетного состояния. Поскольку было показано, что вероятность заселения триплета не зависит от длины волны возбуждающего света, можно считать, что у сложных молекул должна существовать хотя бы одна точка, расположенная в непосредственной близости от наиболее низкого колебательного подуровня возбужденного синглетного состояния.

Для некоторых молекул интеркомбинационная конверсия возникает вследствие термической активации из нижнего на верхние колебательные подуровни  $S_1$ -состояния. Излучательный переход (запрещенный по спину) с триплетного уровня на основной ( $T_1 \rightarrow S_0 + h\nu_{\text{фосф}}$ ) приводит к появлению фосфоресценции с полосой, расположенной в спектре в более длинноволновой области, чем полоса флуоресценции. Время жизни  $\tau_{\text{фосф}}$ , как правило, существенно больше времени жизни флуоресценции и доходит в ряде случаев до секунд. Квантовый выход фосфоресценции  $\Phi_{\text{фосф}}$ , который представляет собой отношение числа квантов фосфоресценции  $n_{\text{фосф}}$  к числу поглощенных квантов  $n_{\text{погл}}$ , т. е.  $\Phi_{\text{фосф}} = n_{\text{фосф}}/n_{\text{погл}}$ , обычно ниже квантового выхода флуоресценции. Например, для красителей в жестких средах  $\Phi_{\text{фосф}} \approx 0,01$ . Однако для молекул некоторых типов квантовый выход фосфоресценции превышает  $\Phi_{\text{фл}}$ .

Константа скорости интеркомбинационной конверсии  $k_{ic}$  в триплетное состояние является важным фотохимическим параметром. В растворах скорость излучательного перехода ( $T_1 \rightarrow S_0$ ) оказывается гораздо меньшей по сравнению со скоростями интеркомбинационной конверсии и (или) тушения триплетного состояния примесями. Поэтому фосфоресценцию наблюдают, как правило, в относительно жестких системах и при низких температурах. Интенсивность фосфоресценции затухает обычно по экспоненциальному закону ( $e^{-t/\tau_{\text{фосф}}}$ ) с одинаковой постоянной  $\tau_{\text{фосф}}$ , представляющей собой среднее время жизни триплетного состояния.

Фосфоресценцию необходимо отличать от замедленной флуоресценции, совпадающей по спектру с обычной (быстрой) флуоресценцией и различающейся с последней лишь большей длительностью

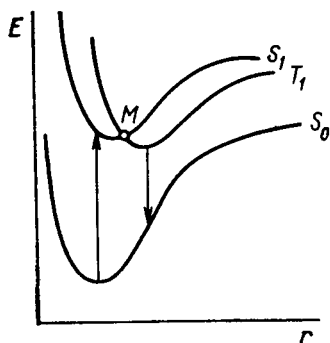


Рис. 24. Зависимость потенциальной энергии ( $E$ ) двухатомной молекулы от межатомного расстояния ( $r$ ):  $S_0$  и  $S_1$  — основной и возбужденный синглетные уровни.  $T_1$  — триплетный уровень (колебательные подуровни не показаны); стрелками вверх и вниз обозначены поглощение и фосфоресценция соответственно

жизни. Появление замедленной флуоресценции связано с возвращением молекулы из триплетного состояния в возбужденное первое синглетное состояние (например, за счет вибрационной энергии, подведенной термически окружением молекулы) с последующим излучательным переходом в основное состояние, что сопровождается возникновением флуоресценции ( $S_1 \rightarrow S_0 + h\nu_{\text{фл}}$ ). Отсюда очевидно, что спектр замедленной флуоресценции сдвигнут в коротковолновую сторону по сравнению со спектром фосфоресценции.

С понижением температуры (с понижением запаса тепловой энергии молекулы) вероятность возвращения триплетной молекулы в возбужденное синглетное состояние (на уровень  $S_1$ ) резко уменьшается; следовательно, возрастает вероятность фосфоресценции и уменьшается вероятность замедленной флуоресценции. Константа скорости фосфоресценции ( $k_{\text{фосф}} = 1/\tau_{\text{фосф}}$ ) обычно в  $10^6 - 10^9$  раз меньше, чем константа скорости быстрой флуоресценции ( $10^9 \text{ с}^{-1}$ ). Таким образом, константа  $k_{\text{фосф}}$  составляет около  $10^3 - 10^{-1} \text{ с}^{-1}$ . Константа интеркомбинационной конверсии  $k_{ic}$  с возбужденного синглетного уровня на триплетный составляет около  $10^7 \text{ с}^{-1}$ . Это означает, что процесс интеркомбинационной конверсии ( $S_1 \rightarrow T$ ) может вполне конкурировать с процессом флуоресценции ( $S_1 \rightarrow S_0$ ).

Прямым отождествлением фосфоресцентного состояния молекулы с триплетным можно считать определение его парамагнетизма. Хорошо известно, что в основном состоянии у большинства органических молекул все электроны спарены, поэтому эти молекулы диамагнитны. Однако в триплетном состоянии такие многоатомные молекулы парамагнитны, поскольку они имеют два электрона с параллельными спинами, которые обычно сильно взаимодействуют с внешним магнитным полем. Еще в конце 40-х годов было показано, что раствор флуоресцеина в стеклообразной борной кислоте при непрерывном интенсивном облучении становится парамагнитным. Позднее удалось обнаружить для ряда фосфоров (из флуоресцеина или трифенилена), что времена затухания фосфоресценции в твердой борной кислоте при комнатной температуре совпадают с временами затухания их парамагнетизма и при этом затухание имеет экспоненциальный вид.

Таким образом, в ходе прямого возбуждения образование триплетного состояния маловероятно ( $S_0 \rightarrow T_1$ ), поскольку спин возбужденного электрона должен изменить свое направление относительно исходного. Это может произойти при существовании магнитного взаимодействия определенного типа с окружающей средой. Такому переходу будет способствовать, например, магнитное поле тяжелого атома. Так интенсивная полоса поглощения и излучения ртути (около 254 нм) связана с переходами между синглетными и триплетными состояниями. Однако обычно переход в триплетное состояние с большей вероятностью происходит именно из синглетного возбужденного состояния. Это связано с тем, что возбужденный электрон распределен в большем объеме и, следовательно, взаимодейст-

вие с окружающими магнитными полями может увеличиваться, что уменьшает магнитное сопряжение электронной пары с антипараллельными спинами.

Молекула в триплетном состоянии может обладать высокой реакционной способностью, поскольку она пребывает в этом состоянии достаточно долгое время (порядка миллисекунд и больше). С другой стороны, в триплетном состоянии распределение электрона происходит в большем объеме, чем в ее синглетном состоянии. По этим причинам в триплетном состоянии у молекулы возрастает вероятность обмена электроном с ближайшим окружением.

Молекулы в триплетном состоянии особенно эффективно дезактивируются растворенными молекулами, которые обладают неспаренными электронами, в частности молекулами кислорода. Эти вещества («тушители») могут взаимодействовать с триплетными молекулами, находясь даже в ничтожных концентрациях. Важную роль в фотохимии сложных многоатомных молекул стали приписывать триплетным состояниям после обнаружения миграции энергии возбуждения по триплетным уровням. Вначале в твердых растворах, а затем и в жидких было обнаружено, что молекула донора (сенсibilизатора), находясь в своем нижнем триплетном состоянии, может при соответствующих условиях передавать энергию возбуждения другой молекуле (акцептору, тушителю), которая находится в основном синглетном состоянии. При этом молекула донора переходит в основное синглетное состояние (безызлучательно), а молекула акцептора становится триплетной. Существенно, что в соответствии с правилом Вигнера суммарный спиновый момент системы в целом сохраняется:



где  $D$  и  $A$  — донор и акцептор соответственно. Необходимо при этом, чтобы триплетный уровень молекулы акцептора был расположен ниже триплетного уровня молекулы донора.

Квантовый выход сенсibilизированной фосфоресценции  $\Phi_{\text{фосф}}^{\text{с}}$  для донорно-акцепторных пар определяется соотношением

$$\Phi_{\text{фосф}}^{\text{с}} = \Phi_{\text{фосф}}^{\text{А}} / (\Phi_{\text{фосф}}^{\text{Д}} - \Phi_{\text{фосф}}^{\text{Д}}),$$

где  $\Phi_{\text{фосф}}^{\text{А}}$  и  $\Phi_{\text{фосф}}^{\text{Д}}$  — квантовые интенсивности фосфоресценций молекул акцептора и донора,  $\Phi_{\text{фосф}}^{\text{Д}}$  — квантовая интенсивность донора в отсутствие акцептора. Установлено, что эффективное расстояние  $R_0$  переноса в твердых растворах (77 К) целого ряда донорно-акцепторных пар (бензофенон—нафталин, бензофенон — киналин, ксантон — нафталин и т. п.) составляет около 1,1 — 1,5 нм, что на порядок больше, чем  $R_0$ , рассчитанное из уравнения Фёрстера, которое для пары бензофенон — нафталин составляло около 0,1 нм. Триплет-триплетный перенос энергии доказан и для жидких

растворов. Механизм такого переноса в принципе аналогичен миграции энергии по триплетным уровням в твердых растворах.

Перенос энергии по триплетным уровням дает возможность использовать этот процесс для инициирования фотохимических реакций молекул, которые не имеют поглощения в спектральной области, подходящей для данных условий эксперимента. Кроме того, с помощью такой миграции энергии оказывается возможным заселять триплетные уровни молекул, которые достаточно трудно заселить при прямом поглощении света из-за того, что лишь небольшой процент возбужденных синглетных состояний переходит в этом случае в триплетные состояния.

При исследовании растворов фотосинтетических пигментов (хлорофиллов *a* и *b*) была обнаружена их способность фосфоресцировать. Так, при возбуждении эфирных растворов хлорофилла *a* около 67 % молекул могут переходить в триплетное состояние. Фосфоресценция была обнаружена также и в нативных фотосинтетических системах при — 196° С (листьях, хлоропластах, клетках некоторых водорослей). Однако *in vivo* фосфоресценция триплетных состояний хлорофилла обычно эффективно тушится, по-видимому, за счет триплет-триплетного переноса энергии от хлорофилла на каротиноиды. Возникновение фосфоресценции будет зависеть не только от температурных условий, но во многом определяется состоянием вещества (например, его агрегацией или фиксацией в жесткой матрице), его молекулярным окружением, а также миграционными эффектами. Отсюда следует, что измерение фосфоресценции может служить весьма эффективным методом для получения информации о состоянии различных компонентов, их реакционной способности, о механизмах миграции энергии возбуждения и т. п.

Для измерения фосфоресценции применяются в принципе те же приборы, что и для регистрации обычной (быстрой) флуоресценции. Однако при этом необходимо отделить по времени быструю флуоресценцию от фосфоресценции или замедленной флуоресценции. Это достигается с помощью специальных устройств — *фосфороскопов*, позволяющих разделить во времени моменты возбуждения и измерения излучения. В фосфороскопах используются либо вращающиеся диски с секторами или прорезями, либо вращающийся цилиндр со щелями. В последнем случае цилиндр вращается относительно двух других неподвижных цилиндров, которые также снабжены прорезями.

Существуют также фосфороскопы, в которых одновременно используются и вращающиеся диски, и вращающиеся цилиндры. В большинстве этих приборов из-за необходимости механической связи между прерывателями на возбуждении и регистрации имеются ограничения в геометрии прибора и размере кюветного отделения. С. Паркер в начале 60-х годов предложил прибор, который был лишен указанных выше ограничений и легко мог быть использован и как спектрофосфорометр и как спектрофлуорометр. В этой установ-



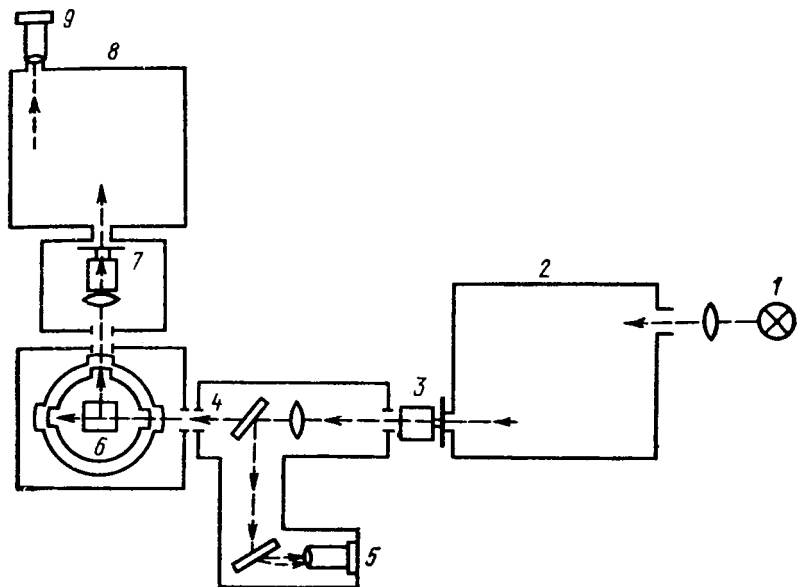


Рис. 25. Схема установки для измерений фосфоресценции и быстрой флуоресценции:

1 — источник света, 2, 8 — возбуждающий и регистрирующий монохроматоры, 3, 7 — диски прерывателей, вращающихся синхронными моторами, 4 — пластинка, разделяющая луч света, 5, 9 — управляющий и регистрирующий фотоумножители, 6 — кювета с образцом в сосуде Дьюара

ке (рис. 25) были использованы два диска, вращаемые отдельными синхронными моторами. Оба мотора обеспечивают постоянный сдвиг по фазе между двумя дисками, поскольку питаются от одного источника переменного тока (с частотой 50 Гц). Можно установить прерыватели в фазе или противофазе, не останавливая их, за счет поворота корпуса одного из моторов вокруг оси вращения. Это дает возможность последовательно регистрировать долгоживущее излучение, а также сумму этого излучения и быстрой флуоресценции. Спектрофлуорометр с помощью этого приспособления легко преобразовать в спектрофосфорометр, установив один прерыватель после выходной щели монохроматора возбуждения, а другой — перед входной щелью регистрирующего монохроматора. Если диски вращаются в фазе, то при таком расположении прибор можно использовать как спектрофлуорометр.

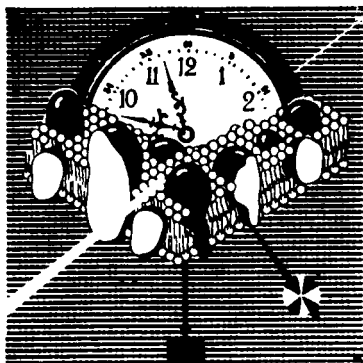
Использование поляризационных светофильтров, принцип расположения которых изложен при описании схемы измерения поляризованной флуоресценции, позволяет на флуорометре с фосфороскопической приставкой производить регистрацию и поляризованной фосфоресценции. Квантовые выходы фосфоресценции можно оп-

ределить, воспользовавшись теми же методами, что и при измерении квантовых выходов быстрой флуоресценции, которые были описаны выше. С учетом коэффициента фосфорометра исправляют записанный спектр фосфоресценции. Затем сопоставляют площади под исправленным спектром фосфоресценции с площадью под исправленным спектром быстрой флуоресценции стандартного вещества с известным квантовым выходом.

Таким же способом определяют и квантовый выход замедленной флуоресценции  $\varphi_{з.фл.}$ . Однако в этом случае, если исследуемое вещество обладает также и быстрой флуоресценцией, квантовый выход которой определен заранее обычным способом,  $\varphi_{з.фл.}$  можно определить без использования стандартного вещества. Поскольку спектры замедленной и быстрой флуоресценции должны совпадать по форме и положению полос, отношение  $\varphi_{з.фл.}/\varphi_{фл.}$  легко вычислить из отношения интенсивностей главных максимумов в соответствующих спектрах (для этих двух типов флуоресценции).

## Глава II

### Динамические спектральные методы исследования биологических систем



В предыдущем разделе изложены разнообразные спектральные методы, которые могут быть использованы при изучении главным образом стационарных свойств биологических систем. Однако сама физическая сущность и практика применения таких спектральных методов указывает на то, что эти методы в принципе могут дать информацию и о *динамических свойствах биологических систем*, т. е. о тех параметрах, которые будут изменяться в системе вследствие протекающих в ней процессов (непосредственно в ходе эксперимента). Такие изменения спектральных параметров, т. е. их динамика, связаны, как правило, с превращениями различных компонентов в сложной биологической системе при протекании реакций, с миграцией энергии и ее захватом фотоактивными центрами, с переходом компонентов из одного состояния в другое, например, в результате конформационных перестроек, окислительно-восстановительных процессов, агрегации, дезагрегации, латеральной подвижности макромолекул и взаимодействия с другими компонентами биомембран, фосфорилирования белков и т. п. Подобного рода превращения могут происходить за разные времена, охватывая широкий диапазон — от нескольких пикосекунд до минут, а иногда и часов. Динамические спектральные методы дают возможность непосредственно следить за кинетикой процессов, происходящих в биологической системе.

Особое значение динамические спектральные методы имеют при изучении различных фотобиологических процессов в тех случаях, когда при действии возбуждающего света в системе происходят быстрое перераспределение энергии, ее утилизация фотохимически

активными молекулами и последующее превращение редокс-компонентов. Именно такая последовательность событий характерна для первичных процессов фотосинтеза, поэтому, как показали экспериментальные исследования, динамические спектральные методы оказались незаменимым инструментом познания механизма утилизации солнечной энергии. Существенно подчеркнуть, что сама специфика биологического объекта и развивающихся в нем процессов потребовала не только модификации ранее известных динамических спектральных методов (например, дифференциальной абсорбционной и флуоресцентной спектроскопии), но и создания новых методик, например таких, как пикосекундная абсорбционная и флуоресцентная спектроскопия, динамическая поляризационная спектроскопия (измерение фотоиндуцированных спектров линейного и кругового дихроизма, фотоселекция, измерение поляризации компонентов быстрой и замедленной флуоресценции) и т. п.

### § 1. Общие принципы дифференциальной абсорбционной спектрофотометрии

В большинстве случаев информация о фотобиологических процессах может быть получена при измерении изменений спектра поглощения под влиянием каких-либо воздействий, например света, электрического поля, добавления в систему компонентов, изменяющих редокс-потенциал среды и т. п. Экспериментальные данные, полученные при регистрации таких индуцированных внешним воздействием абсорбционных спектров (дифференциальных спектров), в сочетании с данными обычной стационарной спектрофотометрии позволяют судить о тех компонентах сложных биологических систем, которые претерпевают превращения в ходе разнообразных фотобиологических реакций.

Применяемые для регистрации абсорбционных изменений дифференциальные спектрофотометры по принципу конструкции можно разделить на несколько типов.

1. Приборы, в которых используется модулированный измеряющий свет и оптическая компенсация. К *первому типу* таких приборов относится спектрофотометр с расщеплением измеряющего света (двухлучевая схема), который попадает на кюветы с контрольным и опытным образцами. При этом интенсивность измеряющего луча должна быть относительно невелика, чтобы не вызвать значительных фотохимических изменений, сравнимых с регистрируемыми при дополнительных воздействиях на объект (освещении, добавлении реагентов и т.п.). Кювета с исследуемым образцом при изучении фотоиндуцированных изменений поглощения освещается немодулированным относительно интенсивным действующим (актиничным) светом. Детектирующая и записывающая система устроена таким образом, что реагирует лишь на сигнал при изменении поглощения образца. Перед фотоумножителем помещается светофильтр, позво-

ляющий уменьшить нежелательные эффекты вследствие рассеяния действующего света.

*Второй тип* приборов основан на так называемом двухволновом принципе, когда измеряющий луч света (длина волны  $\lambda_1$ ) и луч сравнения (длина волны  $\lambda_2$ ) попеременно проходят через одну и ту же кювету с образцом. В лаборатории Л. Н. М. Дейзенса был сконструирован спектрофотометр, основанный одновременно на двухволновом и двухлучевом принципе. В этом приборе было использовано расщепление двух отличающихся по длине волны монохроматических пучков света и, таким образом, на кювету с образцами (опытным и контрольным) попадали по два луча разной длины волны. Эта установка позволяет не только одновременно определять изменение поглощения при двух различных длинах волн, но может быть использована и как обычный двухволновый спектрофотометр.

2. В описанных выше приборах измеряющий луч модулируется механически, поэтому временное разрешение оказывается не лучше чем несколько миллисекунд. Для повышения временного разрешения обычно применяется либо немодулированный свет, либо свет, модулированный с очень высокой частотой. Недостаток первого способа при регистрации быстрых абсорбционных изменений заключается в том, что на фотоумножитель попадают также действующий свет и возбуждаемая им флуоресценция объекта. Таким образом, для надежной регистрации изменений поглощения необходимо устранить влияние флуоресценции и действующего света на измеряемый сигнал.

3. Ряд исследователей фотосинтеза в своих работах использовали дифференциальные спектрофотометры, в которых была применена модуляция действующего света с различной частотой. Были вычислены так называемые времена релаксации абсорбционных изменений интермедиатов (например, пигмента реакционного центра первой фотосистемы фотосинтеза высших растений  $P_{700}$ ). В спектрофотометрах, используемых в работах Б. Кока, между образцом и фотоумножителем помещали прерыватель, так что действующий свет не попадал на фотоумножитель. Такая схема позволила проводить измерения при одинаковой длине волны действующего и измеряющего света и уменьшить артефакты за счет флуоресценции образца.

Во всех вышеупомянутых конструкциях дифференциальных спектрофотометров существенно *геометрия лучей действующего и измеряющего света* (рис. 26).

Наиболее простая система разделения измеряющего и действующего лучей представлена на схеме *А*, однако при других вариациях (*Б*, *В*) освобождается большее пространство для расположения фотоумножителя в конструируемой установке. Преимущество системы разделения по схемам *Г* и *Д* заключается в том, что в этих случаях легче определить интенсивность действующего света в образце и количество (сумму) поглощенной световой энергии. Наибольшую интенсивность действующего света можно получить, используя схе-

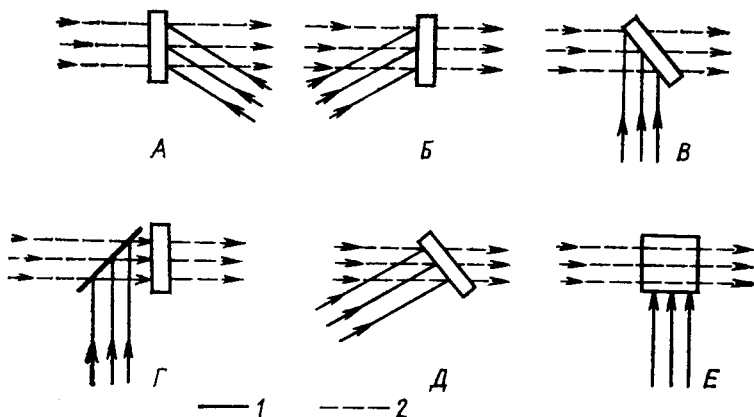


Рис. 26. Расположение действующего (1) и измеряющего (2) лучей относительно кюветы с образцом в абсорбционном дифференциальном спектрофотометре (остальные объяснения см. в тексте)

му *Д*. Взаимоориентация лучей по схеме *Е* менее желательна, поскольку в спектральной области, где происходит сильное поглощение, значительная доля света может не достигать той части образца, через которую проходит измеряющий луч. Подобное явление может приводить к серьезным искажениям спектра действия.

При измерении дифференциальных спектров, характеризующих небольшие или (и) быстрые изменения поглощения, необходимо стремиться к увеличению отношения полезного сигнала к шуму, что достигается повторением операций (например, светового воздействия после темнового интервала), усреднением и накоплением сигналов с помощью компьютерной техники.

## § 2. Метод однолучевой дифференциальной абсорбционной спектроскопии

Биологические объекты сильно рассеивают свет и могут иметь большую оптическую плотность (например, листья растений, клетки водорослей), что значительно снижает интенсивность света, попадающего на приемник излучения (фотоэлемент, фотоумножитель), и затрудняет регистрацию абсорбционных изменений. Использование однолучевых дифференциальных спектрофотометров позволяет повысить интенсивность источника света и добиться увеличения чувствительности при регистрации изменений оптической плотности ( $\Delta D$ ) вплоть до  $10^{-5} D$ . Однако в большинстве случаев эта возможность реализуется лишь при измерении достаточно быстрых процессов, протекающих за времена менее 1 с, поскольку при регистрации более медленных процессов по однолучевой схеме чувствитель-

ность уменьшается вследствие недостаточной стабильности отдельных узлов установки, что приводит к дрейфу нулевой линии и необходимости учитывать влияния внешних наводок на детектируемый сигнал.

Применение однолучевых дифференциальных спектрофотометров сопряжено со значительными сложностями также в тех случаях, когда небольшие индуцированные изменения в оптической плотности сопровождаются неспецифическими изменениями в светорассеянии. Основной принцип метода однолучевой дифференциальной спектроскопии состоит в том, что образец в кювете зондируется слабым монохроматическим измеряющим светом, который, проходя через объект, фиксируется приемником. Возникающий фототок, пропорциональный интенсивности прошедшего через образец света, компенсируется от вспомогательного источника противоположно направленным и равным величине фототока электрическим сигналом ( $i_k$ ). При освещении образца действующим светом (более высокой интенсивности по сравнению с измеряющим светом) или при добавлении к образцу каких-либо реагентов, а также при других возможных внешних воздействиях возникает индуцированный дифференциальный сигнал ( $\Delta i = i - i_k$ ) вследствие изменения поглощения (пропускания), который регистрируется приемником. Варьируя длину волны зондирующего монохроматического света, можно проводить измерение кинетики изменений поглощения при разных  $\lambda$ , а затем, если эта кинетика определяется, например, одним из компонентов исследуемой системы, нетрудно получить спектр изменений поглощения этого компонента  $\Delta i \sim \Delta D = f(\lambda)$ .

Следует иметь в виду, что, хотя однолучевой метод позволяет достичь максимальной чувствительности порядка  $10^{-5} D$ , реальная чувствительность обычных однолучевых дифференциальных спектрофотометров из-за относительной нестабильности оптических, механических и электрических узлов оказывается значительно меньше и величина надежно регистрируемых изменений поглощения не превышает  $10^{-3} D$ .

В случае фотобиологических исследований особенно важно исключить попадание интенсивного действующего света на фотоприемник, что достигается применением светофильтров (или монохроматора), расположенных после объекта, которые пропускают измеряющий свет и не пропускают рассеянный действующий свет. Такой метод существенно ограничивает спектральный диапазон измерений. Этот недостаток может быть в значительной мере устранен, если использовать модуляцию измеряющего света и регистрирующую систему, чувствительную к частоте и фазе измеряемого сигнала.

Однако существует более простое решение проблемы, заключающееся в том, что момент светового воздействия и измерения разделяются во времени с помощью фосфороскопического устройства. Такой метод был впервые использован в работах Б. Кока, Н. В. Ка-

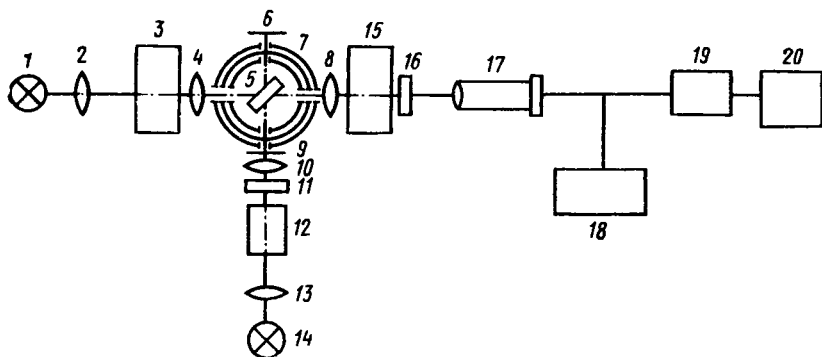


Рис. 27. Схема однолучевого дифференциального спектрофотометра:

1, 14 — источники измеряющего и действующего света, 2, 4, 8, 10, 13 — фокусирующие линзы, 3, 15 — монохроматоры, 5 — кювета с образцом, 6, 9 — фотозатворы; 7 — фосфороскоп, 11, 16 — светофильтры, 12 — тепловой фильтр, 17 — фотоумножитель, 18 — компенсирующее устройство, 19 — усилитель постоянного тока, 20 — самопишущий потенциометр

рапетяна и сотрудников кафедры биофизики Биологического факультета МГУ. На рис. 27 приведена схема установки для измерения кинетики и спектров фотоиндуцированных изменений поглощения.

Исследуемый образец помещают в кювету, расположенную во внутреннем неподвижном стакане фосфороскопического устройства (модулятора). Это устройство состоит из трех коаксиальных цилиндров с прорезями (окнами). Внутренний и внешний стаканы неподвижны и имеют четыре окна, расположенные через  $90^\circ$ ; средний стакан вращается (модулятор) и содержит два окна через  $180^\circ$ . При вращении среднего стакана образец попеременно освещается действующим и измеряющим светом. Такое устройство позволяет изолировать фотоумножитель от прямого попадания на него интенсивного действующего света, а также от возбуждаемой этим светом флуоресценции объекта, поскольку ее время жизни на несколько порядков меньше времени темнового интервала между моментами воздействия и измерения. Таким образом, в момент освещения объекта действующим светом путь к фотоприемнику оказывается закрытым. Когда же на объект попадает измеряющий свет, путь к фотоприемнику открывается. Модулятор фосфороскопического устройства приводится в движение мотором. Модулированный измеряющий свет, прошедший через образец, попадает на фотоумножитель и вызывает переменный электрический сигнал, который интегрируется на большом сопротивлении нагрузки и преобразуется в сравнительно медленно изменяющееся напряжение. Этот сигнал поступает на усилитель постоянного тока и затем на самопишущий потенциометр.

Для уменьшения потерь света вследствие значительного светорассеяния обычно стараются сократить расстояние между образцом и фотокатодом фотоумножителя. Это приводит к увеличению телесного угла, в пределах которого измеряющий свет, прошедший через кювету с образцом, попадает на фотоприемник. После установления образца в кюветное отделение, включения измеряющего света определенной длины волны и компенсации фототока включают действующий свет и регистрируют кинетику изменения поглощения  $\Delta i/i_k = (i - i_k)/i_k = f(t)$ . При небольших значениях оптической плотности образца [в пределах  $(0,2-0,7) D$ ] регистрируемое прибором изменение фототока будет пропорционально изменению его поглощения, т. е.  $\Delta i/i_k \approx \Delta D$ .



После достижения стационарного уровня фотоиндуцированных изменений поглощения действующий свет выключают и регистрируют кинетику восстановления темного уровня поглощения.

Серию кинетических кривых можно измерить при различных длинах волн измеряющего света. При этом следует учесть, что значение тока компенсации ( $i_k$ ) постоянно, а интенсивность источника (лампа накаливания) и чувствительность фотокатода являются функцией длины волны измеряющего света. По этой причине необходимо регулировать интенсивность измеряющего света шириной щели монохроматора или специальной диафрагмой.

В стационарных условиях зависимость величины фотоиндуцированных изменений поглощения от длины волны измеряющего света  $\Delta i/i_k \approx \Delta D = f(\lambda)$  будет представлять собой дифференциальный спектр («свет минус темнота»), который можно построить «по точкам». Скорость переходных процессов изменения поглощения обычно оценивают по времени, в течение которого это изменение достигает половины своего максимального значения ( $t_{1/2}$ ). В качестве источника действующего света для ряда специальных измерений можно использовать лампу-вспышку (импульсный режим).

### § 3. Метод двухлучевой и двухволновой дифференциальной абсорбционной спектрофотометрии

В § 1 гл. I были изложены методы разностной абсорбционной спектрофотометрии, основанные на применении двухлучевого метода. Прибор в этом случае регистрирует разницу между спектром поглощения контрольного и опытного образцов в стационарных условиях:  $\Delta D = f(\lambda)$ . С помощью аналогичной *двухлучевой* методики можно следить и за динамикой процесса непосредственно в ходе эксперимента, измеряя кинетику индуцированных внешними воздействиями изменений поглощения при различных длинах волн или соответствующие дифференциальные спектры таких изменений.

В соответствии с принципом двухлучевой системы модулированный монохроматический измеряющий свет относительно небольшой интенсивности попеременно проходит через кюветы с контрольным и опытным образцами. Кювета с опытным образцом при измерении кинетики или спектров фотоиндуцированных изменений поглощения освещается дополнительно интенсивным немодулированным действующим светом от независимого источника. В случае других воздействий, приводящих, например, к хемоиндуцированным изменениям поглощения, в кювету с опытным образцом вносят соответствующие реагенты (экзогенные доноры или акцепторы электронов, ингибиторы, активаторы, катионы и т. п.), а затем регистрируются кинетические кривые или дифференциальные спектры.

Существуют различные конструкции дифференциальных двухлучевых спектрофотометров, отличающиеся как по способу разделения и модуляции лучей, так и по способу регистрации сигнала.

Наиболее оптимальными следует считать те методы разделения и прерывания лучей, которые обеспечивают минимальные потери в интенсивности света, постоянство по спектру разницы в интенсивности разделенных лучей и стабильность частоты переключения во времени.

Достаточно перспективными можно считать комбинированные системы, в которых делитель монохроматического луча света одновременно служит и его модулятором. Имеются спектрофотометры, в которых применяется система перекрытия лучей без темновых интервалов за счет того, что закрывание одного луча в переходный период компенсируется открыванием другого. Такая система имеет ряд преимуществ: относительно низкий уровень шумов, большую амплитуду сигнала, упрощение электронной части прибора для авторегулирующего устройства усиления при непрерывной записи дифференциальных спектров.

Не останавливаясь на деталях конструкции различных дифференциальных спектрофотометров, подробно изложенных в различных

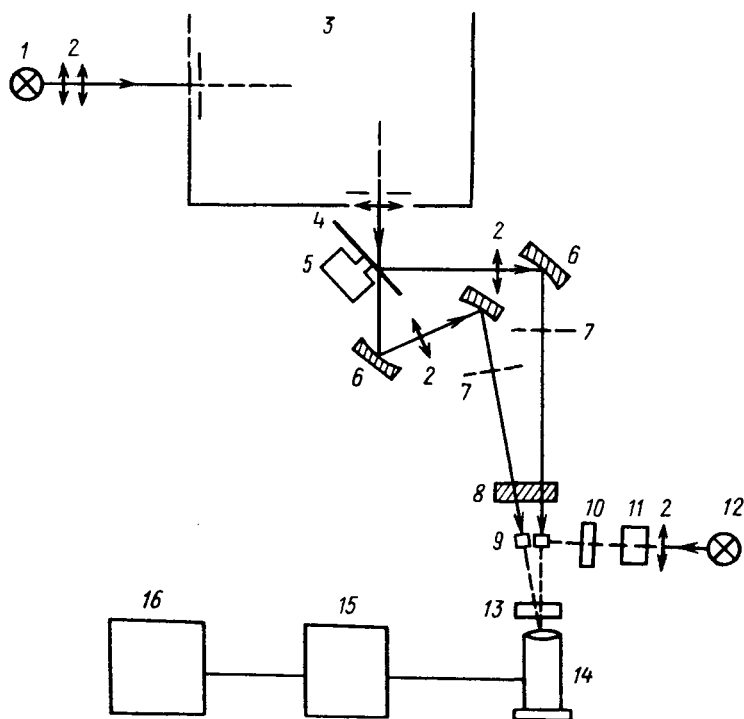


Рис. 28. Схема двухлучевого дифференциального спектрофотометра для измерения светоиндуцированных изменений поглощения (объяснение см. в тексте)

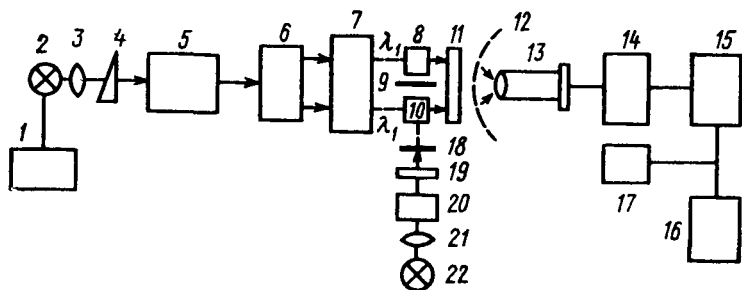


Рис. 29. Схема двухлучевого дифференциального спектрофотометра, собранного на базе оптико-механической части спектрофотометра СФ-10 (объяснение см. в тексте)

руководствах, приведем схемы двух установок, сконструированных в лаборатории Л. Н. М. Дейзенса (рис. 28) и на кафедре биофизики Биологического факультета МГУ (см. рис. 29).

Измеряющий свет (рис. 28) от источника 1 (лампа накаливания) через систему линз 2 попадает в монохроматор 3. Монохроматический пучок света через выходную щель монохроматора и фокусирующую линзу направляется на вращающийся зеркальный диск с секторами 4 (делитель-модулятор), приводимый в движение мотором 5. Таким образом монохроматический луч расщепляется на два модулированных луча, которые, проходя систему фокусирующих линз 2, зеркал 6, аттенуаторов (ослабителей светового потока) 7 и полупрозрачное зеркало 8, попеременно попадают на контрольную и опытную кювету с образцами 9. Кювета с исследуемым образцом освещается интенсивным немодулированным светом от независимого источника (ксенонная лампа) 12, который попадает на нее, проходя предварительно фокусирующую линзу 2, тепловой фильтр 11 и светофильтр 10. Чтобы уменьшить влияние рассеянного действующего света, перед фотокатодом фотоумножителя 14 помещен светофильтр 13. Индуцируемое действующим светом изменение поглощения исследуемого образца ( $\Delta D$ ) приводит к появлению сигнала от фотоумножителя. Система детектирования 15 и записи 16 благодаря своей конструкции чувствительна только к тому сигналу, который возникает за счет абсорбционных изменений.

Основным преимуществом другого прибора (рис. 29) является использование системы модуляции измеряющих монохроматических лучей без темновых интервалов, что дает возможность значительно улучшить параметры установки (увеличить ее чувствительность, стабильность, ввести автоматическую регулировку усиления при непрерывной записи спектров), а также применение интегрирующей сферы для уменьшения влияния светорассеяния биологического объекта на регистрируемые дифференциальные спектры.

Измеряющий свет от лампы накаливания 2, напряжение питания которой стабилизировано полупроводниковым стабилизатором 1, через конденсор 3 попадает на оптический клин 4, а затем в монохроматор 5. Расщепление монохроматического луча осуществляется с помощью поляризационных призм (6 — система расщепления). Оба идентичных луча ( $\lambda_1$ ) проходят через

модулятор 7, который попеременно перекрывает их таким образом, что закрытие одного из лучей в переходный период сопровождается равным ему открытием другого луча. Эти попеременно модулированные монохроматические лучи проходят через кюветы 8, 10 с контрольным и опытным образцами, которые разделены светонепроницаемой перегородкой 9. Далее через светофильтр 11, который помещен на входные окна, свет попадает в интегрирующую сферу спектрофотометра 12, развернутую на  $90^\circ$  и расположенную в непосредственной близости от образцов, а затем на фотокатод фотоумножителя 13.

Опытный образец в кювете 10 освещается действующим светом от лампы накаливания 22, проходя через конденсор 21, тепловой фильтр 20 и сменный светофильтр 19. Перед кюветой 10 расположен механический затвор 18. В крышке кюветного отделения укреплены иглы шприцев, через которые можно вводить необходимые вещества в кюветы без их перестановки. В данном спектрофотометре использована следящая система, которая регулирует световой поток с помощью нейтрального оптического клина на входе монохроматора в сочетании с регулировкой сетевого потока за счет изменения ширины входной и выходной щелей монохроматора. Эта система позволяет поддерживать выходной ток фотоумножителя с точностью до нескольких процентов при развертке спектра для образцов с величиной  $D < 1$ .

Переменная составляющая с выхода фотоумножителя, возникающая из-за разницы в поглощении контрольного и опытного образцов, усиливается широкополосным усилителем 14, затем поступает на синхронный детектор 15 и через балансный катодный повторитель — на систему коррекции нулевой линии 17, что необходимо при непрерывной записи дифференциальных спектров. Кинетические кривые и дифференциальные спектры поглощения регистрируются самопишущим потенциометром 16. Средняя чувствительность такого дифференциального спектрофотометра в спектральной области от 400 до 750 нм составляет около  $5 \cdot 10^{-5}$  единиц оптической плотности, а погрешность измерения не превышает 3 %.

Для изучения кинетических абсорбционных параметров часто применяют *двухволновые* дифференциальные спектрофотометры. Метод двухволновой спектрофотометрии обладает тем преимуществом, что из-за относительно небольшой разницы в величине светорассеяния для двух близких длин волн, проходящих через один и тот же образец, при регистрации индуцированных изменений поглощения значительно уменьшается влияние артефактов, которые связаны с временной зависимостью светорассеяния вследствие оседания или подвижности биологического объекта или при добавлении в кювету различных реагентов. Кроме того, двухволновые спектрофотометры удобно использовать для изучения различных процессов с применением техники остановленного или ускоренного потоков.

С другой стороны, в отличие от двухлучевых в двухволновых приборах необходимо регулировать интенсивность не общего светового потока (до расщепления лучей), а только одного сканирующего луча, тогда как интенсивность луча сравнения (опорного) остается постоянной. Это сопряжено с определенными трудностями: ошибками при автоматической регулировке усиления выходного тока фотоумножителя, особыми требованиями к регулированию интенсивности одного из лучей с высокой точностью, что приводит к ограничению возможности непрерывной записи дифференциальных спектров по

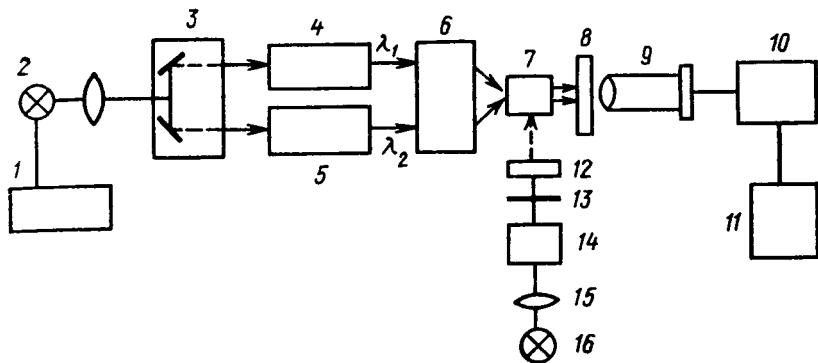


Рис. 30. Схема двухволнового дифференциального спектрофотометра (объяснение см. в тексте)

двухволновому методу; такие спектрофотометры используют главным образом для исследования кинетики процессов.

Двухволновые спектрофотометры нашли широкое применение при изучении кинетических параметров редокс-превращений компонентов электронного транспорта в биологических системах. Длины волн модулированных монохроматических лучей  $\lambda_1$ ,  $\lambda_2$ , падающих на кювету с объектом, обычно выбирают в максимуме изменения поглощения образца и в ближайшей точке с минимальным изменением поглощения. При этом интенсивность света лучей подбирают за счет изменения щелей монохроматоров таким образом, чтобы переменный сигнал на выходе приемника был равен нулю (компенсация переменной составляющей фототока, возникающей из-за разницы в величинах оптической плотности  $D_{\lambda_1}$  и  $D_{\lambda_2}$  объекта в исходном состоянии, который не подвергался дополнительным внешним воздействиям).

Индукирование абсорбционных изменений образца (действующим светом, добавлением реагентов и т. п.) вызовет появление разницы в поглощении ( $\Delta D = D_{\lambda_2} - D_{\lambda_1}$ ) и соответствующего переменного сигнала, регистрируемого после усиления самопишущим устройством (или осциллографом). Зависимость этого сигнала от времени и представляет собой кинетическую кривую индуцированных изменений поглощения.

На рис. 30 представлена схема двухволнового абсорбционного дифференциального спектрофотометра, предназначенного для измерения кинетики изменений поглощения различных биологических объектов. Установка была сконструирована на кафедре биофизики Биологического факультета МГУ.

Свет от источника (лампы накаливания или газоразрядной лампы) 2 со стабилизатором 1 через фокусирующую систему попадает в делитель 3 и, расщепляясь на два луча, проецируется на входные щели двух монохромато-

ров 4, 5. Из выходных щелей монохроматоров два луча разной длины волны  $\lambda_1$ ,  $\lambda_2$  попадают в модулирующее устройство 6, а затем системой зеркал сводятся под минимальным углом на кювету с образцом 7, которая расположена непосредственно перед светофильтром 8 у торца фотоумножителя 9. Действующий свет от лампы накаливания 16 через фокусирующую линзу 15, тепловой фильтр 14, фотозатвор 13 и светофильтр 12 попадает на кювету с образцом. Переменный сигнал с фотоумножителя поступает на предварительный узкополосный усилитель и трехкаскадный усилитель переменного тока 10, а затем на синхронный детектор 11. Для получения опорного напряжения использован фотодатчик (на схеме не показан). Схема синхронного детектора позволяет получить на выходе постоянное напряжение, достаточное для согласования с записывающим устройством. Установка имеет чувствительность около  $10^{-4}$  D и благодаря конструкции кюветного отделения позволяет проводить исследование биологических систем при комнатной и низких температурах.

#### § 4. Общая характеристика метода импульсной спектроскопии

Для исследования кинетики быстротекущих фото процессов еще в 50-х годах был предложен *метод флеш-фотолиза*, или *импульсной спектроскопии*. Метод заключается в том, что при освещении объекта кратковременной мощной вспышкой света поглощающие свет молекулы, переходя в возбужденное состояние, могут накапливаться в избыточной концентрации. При этом образуются и промежуточные короткоживущие фотопродукты. Если вслед за мощной возбуждающей вспышкой через определенный промежуток времени освещать объект более слабым измеряющим светом в импульсном режиме или в виде светового потока постоянной интенсивности, то можно зарегистрировать кинетику изменений поглощения (при определенной  $\lambda$ ) или спектр поглощения таких короткоживущих компонентов (фотопродуктов). Общие принципы лазерной пикосекундной спектроскопии изложены далее, здесь лишь будут рассмотрены методики с применением импульсных ламп.

По способу регистрации различают несколько модификаций метода импульсной спектроскопии. *Первый вариант* модификации заключается в том, что в качестве источника измеряющего света используют импульсную лампу, а вспышки возбуждающего и регистрирующего света синхронизированы по времени. Таким образом, спектр поглощения можно зарегистрировать через определенные временные интервалы, следующие за возбуждающей вспышкой. С помощью этого метода можно измерять кинетику концентрационных изменений возбужденных молекул компонентов. Однако чувствительность этого метода невысока и составляет в среднем около 5—10 % надежно регистрируемых изменений поглощения; невелика, кроме того, точность определения временных характеристик из анализа кинетических кривых.

*Во втором варианте* в качестве измеряющего света используют постоянный источник (лампу постоянного горения). В этом случае регистрируют изменение поглощения при разных длинах волн, а затем по точкам строят дифференциальный спектр поглощения. Этот

метод более чувствителен, он позволяет более надежно исследовать кинетику фотохимических превращений.

*Третий вариант* модификации состоит в том, что после возбуждающей вспышки измеряющий свет, который подается на объект в импульсном или постоянном режиме, регистрируется спектрофотометром со скоростной разверткой для «мгновенной» записи спектральной кривой изменений поглощения (например, за  $10^{-3}$  с).

Использование импульсной техники получило большое распространение при изучении фотопроцессов *in vitro* (фотопревращений красителей, например в результате триплет-триплетного поглощения; фотосинтетических пигментов и т.п.). Однако применение этих методов при исследовании биологических объектов встречает ряд трудностей вследствие низких концентраций образующихся фотопродуктов, гетерогенности образцов, большого светорассеяния. В некоторых лабораториях удалось создать дифференциальные импульсные спектрофотометры для биологических исследований. Конструкция таких приборов обеспечивала условия, при которых объект мог возбуждаться серией последовательных вспышек света, что позволяло увеличивать полезный сигнал и использовать технику его накопления в случае малых изменений поглощения. Существенно, что применение серии возбуждающих вспышек важно не только для накопления сигнала, но и в том случае, если характер кинетических изменений и их величина зависят от номера вспышки (например, как это наблюдается при изучении кислородвыделяющей системы фотосинтезирующих организмов, так называемых S-состояний). Методом импульсной дифференциальной спектроскопии было установлено, что время переноса электрона по электрон-транспортной цепи фотосинтеза составляет  $10^{-5}$  —  $10^{-2}$  с.

На рис. 31 представлена схема импульсного спектрофотометра, сконструированного на кафедре биофизики Биологического факультета МГУ для биологических исследований.

Измеряющий свет от источника (лампа накаливания 90 Вт) 1 фокусируется линзой 2 на входную щель монохроматора 3. Монохроматический луч света с помощью линзы 4 фокусируется на кювету с образцом. Проходя кювету, луч света падает на стеклянную пластинку 19, расположенную под углом  $45^\circ$ , которая отражает около 12 % падающего на нее света. Таким образом, часть света через стеклянную пластинку и светофильтр 20 попадает на фотокатод первого фотоумножителя 21, а часть, отражаясь и поворачиваясь зеркалом 14, через светофильтр 15 на фотокатод второго фотоумножителя 16. Импульсное возбуждение производится двумя лампами 10, 13, расположенными параллельно оптической оси, от которых свет через светофильтры 11, 12 попадает на кювету с образцом. Энергия вспышки для большинства измерений 30—40 Дж, длительность  $5 \cdot 10^{-6}$  с.

Для обычного светового возбуждения (постоянный свет) используют лампу накаливания (750 Вт) 5, от которой луч через систему линз 6, 8, тепловой 7 и стеклянный 9 светофильтры попадает на образец. Интенсивность измерительного света составляла около  $10^{-3}$  Вт·см $^{-2}$ , а постоянного возбуждающего света — около  $10^{-2}$ . Импульсное возбуждение производится однократными или последовательными двумя вспышками через регулируемые интервалы времени от 50 мкс до нескольких минут. Электрический сигнал от первого фо-

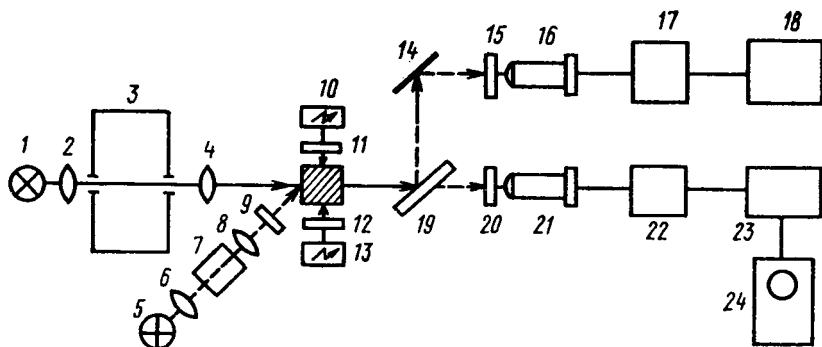


Рис. 31. Схема импульсного дифференциального спектрофотометра (объяснение см. в тексте)

тоумножителя поступает на эмиттерный повторитель 22, затем на широкополосный усилитель 23 и регистрирующий прибор (осциллограф) 24. Со второго фотоумножителя сигнал усиливается электрометрическим услителем постоянного тока 17 и поступает на самопишущий потенциометр 18. Схема регистрации обеспечивает чувствительность порядка  $0,2\% \Delta D$ . Установка позволяет регистрировать кинетику «быстрых» процессов с характерными временами  $\tau > 10^{-5}$  с. Исследование процессов, протекающих за более короткие времена, производят на установках с лазерным возбуждением (см. §2 гл. 11).

## § 5. Метод поляризационной дифференциальной абсорбционной спектрофотометрии (фотоселекция, спектры фотоиндуцированных изменений линейного и кругового дихроизма)

Для получения дополнительной информации о характере индуцированных изменений наряду с обычной дифференциальной спектрофотометрией применяют *поляризационную дифференциальную абсорбционную спектрофотометрию*, с помощью которой исследуют не только обычные параметры изменений поглощения (величину  $\Delta D$ , кинетические кривые, характерные времена), но и ориентацию дипольных моментов переходов таких изменений относительно плоскости поляризации действующего света или относительно осей симметрии изучаемой системы. Можно следить также за изменением характера взаимодействия между хромофорами и конформационными перестройками макромолекул. Наконец, можно производить селективную фотодеструкцию определенным образом ориентированных молекул при действии на образец поляризованным световым потоком.

**Метод фотоселекции.** Этот метод заключается в том, что изотропная система (хаотически ориентированные молекулы образца) освещается плоскополяризованным действующим светом, который создает анизотропию, за счет преимущественного возбуждения моле-



кул с моментами переходов  $\mu_i$ , параллельными электрическому вектору  $E$  действующего света. Вызванные этим вертикально поляризованным светом изменения поглощения образца зондируются измеряющим лучом, поляризованным вначале параллельно, а затем перпендикулярно поляризации действующего луча. На рис. 32 приведена наглядная схема, иллюстрирующая метод фотоселекции. Вероятность того, что молекула, имеющая момент перехода  $\mu$ , перейдет в возбужденное состояние при освещении действующим вертикально поляризованным светом (вектор  $E$  параллелен оси  $z$ ), будет пропорциональна  $\cos^2\varphi$ , где  $\varphi$  — угол между  $\mu$  и осью  $z$ . Отсюда ясно, что главным образом будут возбуждаться молекулы, моменты переходов которых параллельны оси  $z$ .

Возбуждающий свет в зависимости от условий эксперимента может быть импульсным или постоянным. Дихроизм светоиндуцированных изменений поглощения определяется в виде отношения  $P = (\Delta A_{\parallel} - \Delta A_{\perp}) / (\Delta A_{\parallel} + \Delta A_{\perp})$ , где  $P$  — коэффициент поляризации, или в виде дихроичного отношения  $D = \Delta A_{\parallel} / \Delta A_{\perp}$  ( $\Delta A_{\parallel}$  и  $\Delta A_{\perp}$  — величины изменений поглощения при параллельной и перпендикулярной поляризации измеряющего луча соответственно). Варьируя длину волны измеряющего света, можно зарегистрировать кинетические кривые фотоиндуцированных изменений поглощения для параллельной и перпендикулярной поляризации при различных  $\lambda$ , а затем по точкам построить спектр поляризации ( $P = f(\lambda)$ ), дихроичного отношения ( $D = f(\lambda)$ ) или дифференциальные спектры ( $\Delta A_{\parallel} = f(\lambda)$  и  $\Delta A_{\perp} = f(\lambda)$ ).

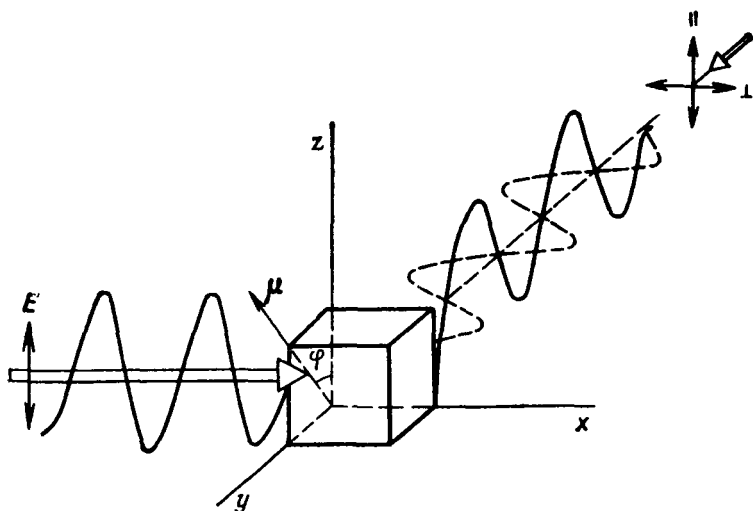


Рис. 32. Иллюстрация метода фотоселекции (объяснение см. в тексте)

Формулы, выведенные для различных вариантов ориентации объектов (см. § 5 гл. I), можно использовать и при фотоселекции. Однако в последнем случае (предварительно не ориентированный образец) достичь идеальной ориентации фотоселекцией невозможно, поскольку возбуждаться будут не только те молекулы, для которых  $\mu \parallel E \parallel z$  ( $\varphi = 0$ ) (рис. 32), но и другие молекулы с эффективностью, пропорциональной  $\cos^2\varphi$ . Для объектов с осевой симметрией предельные значения дихроичного отношения, определяемые с помощью метода фотоселекции, равны 3 и 0,5 в случае параллельной и взаимно перпендикулярной ориентации электрического вектора возбуждающего и измеряющего света соответственно. Коэффициенты поляризации при этом достигают значений 0,5 и — 1/3. В случае кругового вырождения возбуждающего или регистрируемого перехода в экспериментах по фотоселекции дихроичное отношение не может превышать 3/4, а коэффициент поляризации не может быть более 1/7. Существенно подчеркнуть, что если метод измерения линейного дихроизма дает возможность определить углы между моментами перехода и осями симметрии исследуемого объекта, то метод фотоселекции позволяет вычислить углы между парами переходных моментов. Использование обоих методов весьма желательно для получения более полной информации об ориентации таких переходов. Метод фотоселекции применяют и в том случае, если специфика объекта не позволяет ориентировать его другими способами.

Существуют различные конструкции установок для исследования объектов методом фотоселекции. Обычно это дифференциальные импульсные установки, принцип работы которых был рассмотрен выше. Возбуждение производится импульсными лампами в режиме либо одиночных вспышек, либо серий вспышек, следующих с различными временными интервалами. При фотоселекции используется вертикально поляризованный свет. Измеряющий монохроматический свет, поляризованный в двух взаимно перпендикулярных направлениях (параллельном и перпендикулярном направлению ориентации плоскости поляризации возбуждающего света), зондирует объект в течение определенного промежутка времени, что зависит от условий эксперимента.

Так, при изучении иммобилизованных частиц фотосистемы I высших растений с помощью фотоселекции использовали модификацию импульсного дифференциального спектрофотометра, применяемого для исследования фотоиндуцированных изменений поглощения с временными параметрами  $10^{-6}$  —  $10^{-5}$  с.

Образец, помещенный в специальное кюветное отделение, освещался возбуждающей вспышкой света (от ксеноновой лампы), проходящего предварительно интерференционные светофильтры и неподвижный поляризатор. Длительность вспышки составляла около 15 мкс. Измеряющий свет через монохроматор и подвижный поляризатор, поворот которого обеспечивал изменение направления плоско-

сти поляризации при зондировании, попадал на образец. Перед образцом был установлен фотозатвор, регулирующий время зондирования, чтобы избежать стационарного изменения поглощения объекта до включения возбуждающей вспышки. Время зондирования составляло около 200 мс. Интенсивности возбуждающего и измеряющего света различались в пять раз. Такое увеличение интенсивности измеряющего света позволило улучшить разрешающую способность установки ( $\Delta I/I = 10^{-5}$ ).

Чтобы преодолеть артефакты, вызванные релаксационными процессами фотоумножителя, фотокатод дополнительно освещался; время действия света также регулировалось фотозатвором. Оба фотозатвора (для измеряющего и дополнительного света) работали в режиме попеременного перекрывания таким образом, что уровень светового потока на фотокатоде оставался практически постоянным. Чтобы избежать появления дихроизма, индуцированного рассеянным возбуждающим светом, и влияния поляризованной флуоресценции, дополнительные поляризаторы между образцом и фотоумножителем не ставились. Регистрируемые сигналы изменений поглощения индуцировались многократно, усреднялись компьютером и записывались в виде кинетических кривых  $\Delta A_{\parallel} = f(t)$ ,  $\Delta A_{\perp} = f(t)$  при разных длинах волн измеряющего света. Затем по точкам строился спектр дихроичного отношения  $\Delta A_{\parallel}/\Delta A_{\perp} = f(\lambda)$ , поляризации  $(\Delta A_{\parallel} - \Delta A_{\perp})/(\Delta A_{\parallel} + \Delta A_{\perp}) = f(\lambda)$  или анизотропии  $(\Delta A_{\parallel} - \Delta A_{\perp})/(\Delta A_{\parallel} + 2 \Delta A_{\perp}) = f(\lambda)$ .

Эксперименты позволили установить, что дипольные моменты переходов каротиноидов и фотоиндуцированных изменений поглощения пигмента реакционного центра фотосистемы I ( $P_{700}$ ) ориентированы практически одинаковым образом (параллельно друг другу). Дихроичное отношение при этом не превышало величины  $4/3$ , что характерно для систем с круговым вырождением переходного момента.

Измерение кинетики и спектров фотодихроизма методом фотоселекции может быть осуществлено и с помощью однолучевого дифференциального спектрофотометра с фосфороскопом (см. рис. 27). В этом случае поляризация возбуждающего и измерительного света может производиться, например, призмами Рошона и Франка — Риттера соответственно. Такую установку использовали для изучения кинетики фотодихроизма реакционных центров фотосинтезирующих бактерий при 100 К. Исследовали кинетику изменений поглощения  $\Delta A_{980}$  при различной взаимной ориентации плоскости поляризации возбуждающего и измеряющего света (параллельной или перпендикулярной соответственно). Измеряли также и спектры изменений поглощения, вызванных возбуждающим светом (при 980 и 890 нм), который был поляризован параллельно и перпендикулярно по отношению к измерительному свету. Результаты таких исследований позволили получить информацию о характере взаимо-

действия и ориентации пигментов в реакционных центрах некоторых фотосинтезирующих бактерий.

**Метод фотоиндуцированного линейного дихроизма.** Этот метод для ориентированных образцов в отличие от фотоселекции уже не требует использования поляризованного возбуждающего светового потока. Анизотропия в этом случае достигается предварительной ориентацией объекта (при наложении на него магнитного поля, при деформации геля или растяжении пленок, содержащих объект, и т. п.). Использование ориентированных образцов позволяет увеличить чувствительность метода при регистрации фотоиндуцированных изменений дихроизма по сравнению с фотоселекцией. Изменения поглощения ориентированного объекта вызываются неполяризованным возбуждающим светом, а измеряющий поляризованный свет зондирует образец при разных длинах волн. Направление ориентации плоскополяризованного измеряющего луча выбирают параллельно и перпендикулярно оси или плоскости ориентации объекта соответственно (например, оси вытягивания геля или плоскости мембраны). Измеряют кинетику и спектры фотоиндуцированных изменений поглощения при параллельной  $\Delta A_{\parallel} = f(\lambda)$  и перпендикулярной  $\Delta A_{\perp} = f(\lambda)$  поляризации зондирующего луча.

Данные могут быть представлены в виде спектральной зависимости дихроичного отношения фотоиндуцированных изменений поглощения  $D(\Delta A) = \Delta A_{\parallel} / \Delta A_{\perp}$  или степени поляризации  $P(\Delta A) = (\Delta A_{\parallel} - \Delta A_{\perp}) / (\Delta A_{\parallel} + \Delta A_{\perp})$ . С помощью такого метода исследовали фотодихроизм субхлоропластных частиц, пигмент-белковых комплексов высших растений, хромофоров и реакционных центров фотосинтезирующих бактерий. Получены результаты об ориентации дипольных моментов переходов фотоактивных компонентов этих объектов и высказаны предположения о возможном расположении макромолекулярных комплексов в нативных фотосинтетических мембранах. Для изучения фотодихроизма ориентированных образцов может быть использован однолучевой дифференциальный спектрофотометр с фосфороскопом (см. рис. 27). После монохроматора измеряющий луч проходит через подвижный поляроид, при вращении которого изменяется ориентация плоскости поляризации зондирующего светового потока. Существует вариант однолучевого дифференциального спектрофотометра с чувствительностью порядка  $10^{-4}$  единиц оптической плотности, в котором возбуждающий и измеряющий лучи коммутируются дисковым фосфороскопом.

Метод фотоиндуцированных изменений дихроизма нашел применение при изучении вращательной и латеральной диффузии мембранных белков. Оптические методы, и прежде всего поляризационная флуорометрия, основные особенности и способы регистрации которой были изложены ранее, в принципе давно применяются для исследования вращательных движений макромолекул в водных растворах. Метод измерения поляризованной флуоресценции исполь-

зовался достаточно успешно, поскольку время жизни флуоресценции ( $\sim 10^{-8}$  с) несильно отличается в этих случаях от измеряемых времен вращательной релаксации. Однако, когда вращательная релаксация молекулы происходит в течение более длительного времени ( $\tau > 10^{-6}$  с), флуоресцентный метод не работает, поскольку излучение затухает раньше, чем может осуществиться поворот молекулы.

В частности, показано, что вращение молекулы родопсина в наружном мембранном сегменте при 20 °С происходит за 20 мкс. Если предположить, что вязкость мембраны по крайней мере в 100 раз больше вязкости водной среды, можно рассчитать, что времена релаксации внутренних глобулярных мембранных белков составляют микросекунды и более. Для того чтобы измерить такие относительно медленные движения с помощью оптической спектроскопии, необходимо, чтобы времена жизни возбужденного состояния молекулы или образующихся фотопродуктов были достаточно длительными. Эти соображения позволили предложить в качестве основного метода измерения вращательных движений мембранных белков *метод триплетных зондов*, обладающих относительно большим временем жизни. Триплетные зонды использованы также и для изучения подвижности макромолекулярных комплексов в водных растворах. Наиболее часто применяют в качестве триплетных зондов производные зозина, которые ковалентно связываются с молекулами белка.

Спектроскопический метод измерения вращательной подвижности основывается на *фотоселекции*, когда поляризованный действующий свет создает популяцию возбужденных молекул с определенной ориентацией в исходно изотропной системе. Сигналы, возникающие от таких возбужденных молекул, в основном отражают их анизотропное распределение, что выражается в дихроизме регистрируемых абсорбционных изменений. Если возбуждение производится коротким импульсом света, начальная абсорбционная анизотропия со временем уменьшается (затухает), поскольку молекулы вследствие броуновских движений распределяются хаотически. Измерение *скорости затухания анизотропии* позволяет определить время вращательной релаксации молекулы. Кинетические измерения *фотодихроизма* производятся в соответствии с общим принципом фотоселекции, когда возбуждение осуществляется вспышкой вертикально поляризованного света, а измеряющий свет, поляризованный параллельно и перпендикулярно возбуждающему лучу, зондирует образец. В современных приборах измеряющий луч с помощью специальной системы расщепляется на вертикально и горизонтально поляризованные составляющие, что позволяет одновременно регистрировать абсорбционные изменения для двух компонентов:  $\Delta A_{\parallel}$  и  $\Delta A_{\perp}$ . Такие приборы имеют временное разрешение около нескольких микросекунд.

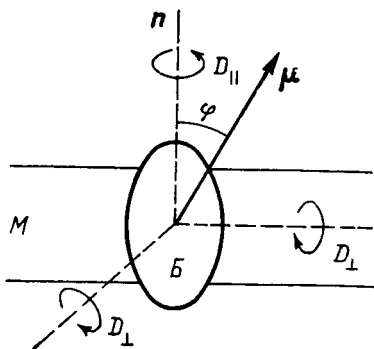


Рис. 33. Модель, используемая для интерпретации вращательных движений белка (Б) в мембране (М), измеряемых с помощью фотондуцированного дихроизма:

$\varphi$  — угол между нормалью (n) к плоскости мембраны и вектором абсорбционного дипольного момента перехода ( $\mu$ )

константа, которая зависит от угла между дипольными моментами переходов, использованных для возбуждения и измерения, а также от инструментальных факторов.

В случае мембранных белков необходимо учитывать анизотропию структуры мембраны, которая фактически должна определять их анизотропное вращение. На рис. 33 показана возможная модель, используемая для анализа экспериментальных данных; в соответствии с ней вращательные движения белка могут быть охарактеризованы двумя диффузионными коэффициентами:  $D_{\parallel}$  — для вращения вокруг нормали к плоскости мембраны и  $D_{\perp}$  — для вращения вокруг осей лежащих в плоскости мембраны.

Для такой модели

$$r(t) = \sum_{i=1}^3 A_i \exp(-E_i t), \quad \text{где}$$

$$A_1 = (6/5) \sin^2 \varphi \cos^2 \varphi; \quad A_2 = (3/10) \sin^4 \varphi;$$

$$A_3 = (1/10) (3 \cos^2 \varphi - 1)^2; \quad E_1 = 5D_{\perp} + D_{\parallel}; \quad E_2 = 2D_{\perp} + 4D_{\parallel}; \quad E_3 = 6D_{\perp}.$$

В том случае, если дипольные моменты переходов, которые используют для возбуждения и регистрации, параллельны и исходя из того, что большинство интегральных белков сохраняет постоянную ориентацию, пронизывая мембрану (трансмембранные белки), последнее выражение можно упростить, полагая, что  $D_{\perp} \approx 0$ :

$$r(t) = A_1 \exp(-D_{\parallel} t) + A_2 \exp(-4D_{\parallel} t) + A_3.$$

Полученные данные анализируют, рассчитывая анизотропию поглощения  $r(t) = (\Delta A_{\parallel}(t) - \Delta A_{\perp}(t)) / (\Delta A_{\parallel}(t) + 2 \Delta A_{\perp}(t))$ , где  $\Delta A_{\parallel}(t)$  и  $\Delta A_{\perp}(t)$  — величины изменений поглощения за время  $t$  после вспышки для параллельной и перпендикулярной составляющих по отношению к поляризации возбуждающего импульса. Величина  $r(t)$  не зависит от времени жизни сигнала, а только от вращательных движений, когда абсорбционные изменения затухают экспоненциально. Можно установить связь между  $r(t)$  и коэффициентом вращательной диффузии ( $D_R$ ). Для специального случая изотропного вращения  $r(t) = r'_0 \exp(-6 D_R t)$ , где  $r'_0$  —

Тогда  $r(t)$  затухает, достигая в пределе величины  $A_3$ . Это не зависящее от времени значение  $r(t) = A_3$  называется *остаточной анизотропией*. В принципе диффузионный коэффициент  $D_{\parallel}$  связан с размером белка и вязкостью мембраны. Если аппроксимировать белок цилиндром с осью симметрии, перпендикулярной плоскости мембраны, то  $D_{\parallel} = kT/(4\pi a^2 h \eta)$ , где  $a$  — радиус цилиндра,  $h$  — длина части цилиндра, погруженной в мембрану,  $\eta$  — вязкость мембраны.

В этом рассуждении считали, что угол  $\varphi$  вполне определен. Такие ситуации характерны, например, для хромофора ретиналя бактериородопсина. Однако эозиновая метка, связанная с белком, обладает независимыми движениями. Эти движения достаточно быстры и ограничены, что приводит к уменьшению измеряемого значения  $r(t)$  по сравнению с ожидаемым, поскольку анизотропия частично теряется в течение более короткого временного интервала, не разрешаемого установкой. Кроме того, к уменьшению измеряемой анизотропии приводят также инструментальные (аппаратурные) эффекты. В первом приближении эти факты требуют внесения поправок в основное уравнение:

$$r(t) = [r_0/(A_1 + A_2 + A_3)] [A_1 \exp(-D_{\parallel} t) + A_2 \exp(-4D_{\parallel} t) + A_3],$$

где  $r_0$  — экспериментальная абсорбционная анизотропия при  $t = 0$ .

Следует учитывать также, что зонд вряд ли локализуется только на одном участке данного белка. Так как зонд в различных местах белка, видимо, должен быть ориентирован по-разному, то  $r(t)$  будет различной для каждого места локализации метки вследствие зависимости коэффициентов  $A_1, A_2, A_3$  от угла  $\varphi$ . Однако при условии, что время жизни абсорбционного перехода одинаково для каждого места локализации, наблюдаемое значение  $r(t)$  для всех таких мест просто усредняется:  $r(t) = (1/N) \sum_{i=1}^N r_i(t)$ , где  $r_i(t)$  — временная зависимость анизотропии поглощения для  $i$ -го места.

В более сложных случаях, когда метка на различных участках белка имеет различное время жизни триплетных состояний,  $r(t)$  уже не является более функцией только вращательных движений. В этом случае

$$r(t) = \frac{\sum_{i=1}^N S_i \exp(-t/\tau_i) r_i(t)}{\sum_{i=1}^N S_i \exp(-t/\tau_i)},$$

где  $\tau_i$  — время жизни,  $S_i$  — весовой фактор для  $i$ -го участка. Величина  $r(t)$  будет различаться для каждого участка и также зависеть от времени жизни.

**Метод фотоиндуцированных спектров кругового дихроизма** можно использовать для изучения конформационных переходов и структурных особенностей фотоактивных компонентов биологических систем.

В институте биохимии им. А. Н. Баха АН СССР В. В. Шубиным и Н. В. Карапетяном этот метод был разработан применительно к исследованию структурной организации первичного донора электронов фотосистемы I высших растений ( $P_{700}$ ). Суть метода заключается в том, что регистрируют разницу между спектрами кругового дихроизма (КД) образца в темноте и на свету (при освещении действующим светом от независимого источника). Дифференциальный спектр КД («темнота минус свет») представляет собой, таким образом, зависимость фотоиндуцированных изменений разностных дихроичных поглощений  $\Delta A_{\tau-c}$  от длины волны измеряющего света:  $\Delta A_{\tau-c} = (A_L - A_R)_\tau - (A_L - A_R)_c = f(\lambda)$ , где  $A_L$  и  $A_R$  — поглощение света левой и правой круговой поляризации. Если использовать разностные дихроичные коэффициенты экстинкции, то  $\Delta \epsilon_{\tau-c} = (\epsilon_L - \epsilon_R)_\tau - (\epsilon_L - \epsilon_R)_c = f(\lambda)$ . Величину  $(\epsilon_L - \epsilon_R)$  можно определить из соотношения  $(\epsilon_L - \epsilon_R) = (A_L - A_R)/(cd)$ , где  $c$  — концентрация, моль/л;  $d$  — толщина кюветы, см. Для расчета сил вращения  $R$  можно воспользоваться формулой Моффита и Московица, пренебрегая фактором Лоренца:

$$R = 22,9 \cdot 10^{-40} \int \frac{\epsilon_L - \epsilon_R}{\nu} d\nu.$$

Для измерения спектров фотоиндуцированных КД авторы сконструировали фосфороскопическую приставку к стандартному дихрографу (JASCO-40AS). Образец в кювете помещали в фосфороскоп и освещали действующим светом интенсивностью  $3 \cdot 10^{-3}$  Вт/см<sup>2</sup> от лампы накаливания с помощью двух световодов под углом 90° к измеряющему свету, попадающему на образец от дихрографа. Темновой интервал между действующим и измеряющим светом варьировали от 3 до 15 мс.

Спектральная полуширина щели монохроматора дихрографа составляла 2 нм. Для измерения спектров фотоиндуцированного КД использовали накопитель сигналов в режиме непрерывной регистрации (8 или 16 циклов накопления в темноте минус столько же циклов на свету) и по точкам с накоплением сигнала при одной длине волны (2—3 мин накоплений в темноте минус столько же накоплений на свету).

С помощью этого метода для пигмент-белковых комплексов фотосистемы I удалось показать, что при фотоокислении пигмента реакционного центра наряду с основными компонентами димерного расщепления в спектре фотоиндуцированного КД проявляются минорные компоненты антенного хлорофилла. Это позволило высказать предположение о природе комплекса реакционного центра фотосистемы I.



## § 6. Метод температурного скачка при измерениях фотоиндуцированных изменений поглощения

В институте общей физики АН СССР был разработан метод и сконструирована установка для исследования влияния теплового импульса, создаваемого излучением  $\text{CO}_2$ -лазера, на оптические свойства биологических объектов (в частности, фотосинтетических мембран и пигмент-белковых комплексов). Этот метод чрезвычайно перспективен для прямого экспериментального определения временных и энергетических параметров конформационных переходов комплексов реакционных центров, контролирурующих эффективность переноса электронов в процессе фотосинтеза. Суть метода температурного скачка заключается в том, что система в результате достаточного нагрева в течение короткого времени (теплового импульса) может перейти в новое состояние (например, изменить свою конформацию). Функциональные свойства этого состояния можно тестировать, исследуя кинетику фотоиндуцированных изменений поглощения.

Таким образом, предложенный метод фактически объединяет между собой методы температурного скачка и дифференциальной абсорбционной спектрофотометрии. Этот метод позволил провести исследование температурной зависимости изменений функциональной активности препаратов реакционных центров фотосинтезирующих бактерий при их импульсном разогреве. Принципиальная блок-схема установки показана на рис. 34.

Образец в специальной кювете 12, помещенный в криостат 13, подвергается импульсному разогреву за счет поглощения от  $\text{CO}_2$ -лазера 1 (средняя мощность 10 Вт; длина волны излучения 10,6 мкм). Величина разогрева регулируется временем открытия затвора 2. Часть излучения (около 8 %) отводится с помощью плоскопараллельной пластинки из  $\text{BaF}_2$  3 на калориметр 4. Действующий свет от источника 8, в качестве которого служит гало-

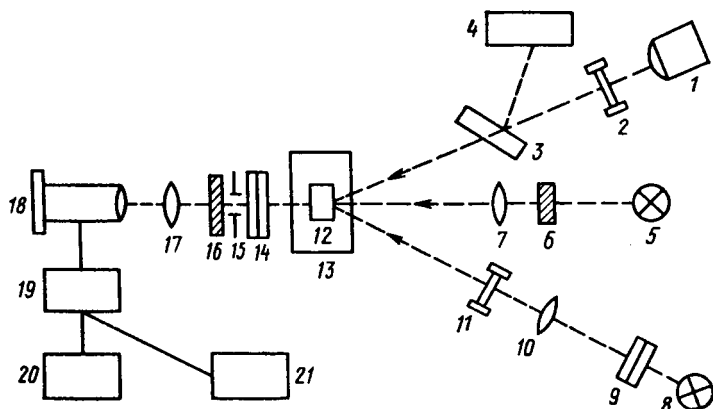


Рис. 34. Схема установки для регистрации фотоиндуцированных изменений поглощения при воздействии теплового импульса (объяснение см. в тексте)

генная лампа мощностью 60 Вт, через стеклянные фильтры 9, фокусирующую линзу 10 и затвор 11 попадает на образец, вызывая в нем фотоиндуцированные изменения поглощения. Измеряющий свет от источника 5 (лампа накаливания с мощностью до 10 Вт) проходит интерференционные фильтры 6 и фокусируется на образец линзой 7. Далее свет проходит через образец, стеклянные фильтры 14, диафрагму 15, интерференционные фильтры 16 и фокусируется линзой 17 на фотокатод фотоумножителя 18. Сигнал от фотоумножителя поступает на усилитель 19, а затем регистрируется осциллографом 20 и самопишущим потенциометром 21.

Для снятия температурных зависимостей фотоиндуцированных изменений поглощения образец охлаждается жидким азотом в криостате, одно из окон которого, выполненное из  $\text{BaF}_2$ , прозрачно для излучения  $\text{CO}_2$ -лазера.

При измерениях на образец посылается тепловой импульс, а затем через определенный временной интервал (время задержки), который можно варьировать в зависимости от экспериментальных условий, производится световое воздействие, индуцирующее изменение поглощения.

## § 7. Методы динамической спектрофлуориметрии

Для исследования динамических и структурных свойств различных биологических систем и макромолекул наряду с абсорбционными широко используют также и флуоресцентные методы. При этом может изучаться как флуоресценция самих биологических молекул (клеток, листьев растений и т. п.), так и *флуоресцентных меток* (или зондов), непосредственно связанных с такими структурами (например, молекулой белка, мембраной и т. п.). В зависимости от конкретной природы изучаемых явлений исследуют динамику как быстрой флуоресценции ( $\tau_{\text{фл}} = 10^{-9} - 10^{-8}$  с), так и послесвечения (замедленной флуоресценции или фосфоресценции,  $\tau_{\text{п}} > 10^{-6}$  с).

Для исследования изменений флуоресценции, так же как и в случае динамической абсорбционной спектроскопии, используют дифференциальные спектрофотометры. Наиболее быстрые изменения флуоресценции изучают с помощью импульсной техники, когда возбуждающий световой импульс генерируется лампой-вспышкой ( $\tau = 10^{-6}$  с) или лазером ( $\tau = 10^{-12} \div 10^{-8}$  с). Основные принципы импульсной спектрофлуориметрии будут рассмотрены позже. При исследовании динамики относительно медленных процессов, развивающихся за времена порядка миллисекунд и более ( $\tau \geq 10^{-3}$  с), применяют метод фотоиндуцированных изменений флуоресценции.

**Метод фотоиндуцированных изменений флуоресценции.** Фактически он аналогичен методу фотоиндуцированных изменений поглощения, регистрируемых с помощью дифференциальной спектроскопии. Объект освещают интенсивным действующим светом, индуцирующим фотопроект, а более слабый по интенсивности измеряющий свет, возбуждающий флуоресценцию, позволяет следить за кинетикой этого процесса. Метод нашел широкое применение при исследовании изменений флуоресценции, сопровождающих началь-

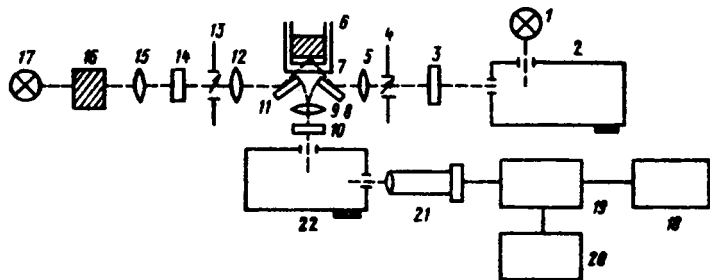


Рис. 35. Схема модифицированного спектрофлуорометра для регистрации фотоиндуцированных изменений флуоресценции (объяснение см. в тексте)

ные этапы процесса фотосинтеза. Выяснено, что при освещении фотосинтезирующих объектов интенсивность флуоресценции хлорофилла *a*, прежде чем достичь стационарного уровня, изменяется, отражая переходные процессы, связанные с состоянием реакционных центров, скоростью переноса электрона по цепи редокс-компонентов, конформационными изменениями фотосинтетических мембран и т. п. Такие переходные индукционные кривые выхода флуоресценции обусловлены изменяющейся ее частью, т. е. так называемой *переменной флуоресценцией*. Существуют различные типы установок для регистрации фотоиндуцированных изменений выхода флуоресценции.

В лаборатории Говинджи (США) разработан универсальный спектрофлуорометр, позволяющий измерять спектры флуоресценции, спектры возбуждения флуоресценции и светоиндуцированные изменения выхода флуоресценции у различных фотосинтезирующих организмов. В приборе использованы два монохроматора (на возбуждении и регистрации) и дополнительное освещение для индуцирования изменений флуоресценции. Схема установки представлена на рис. 35.

Измеряющий свет, возбуждающий флуоресценцию, от источника (лампа накаливания) 1 через монохроматор 2, светофильтр, отсекающий рассеянный действующий свет 3, фотозатвор 4 фокусируется линзой 5 и поворотным зеркалом 8 под углом  $30^\circ$  на плоское дно сосуда Дьюара 6, содержащего кювету с образцом 7 (толщина слоя 1 мм). Испускаемая образцом флуоресценция фокусируется линзой 9 и, проходя светофильтр 10, не пропускающий рассеянный действующий свет, попадает на входную щель регистрирующего монохроматора 22. Из выходной щели монохроматора регистрируемое излучение (определенной длины волны) попадает на фотокатод фотоумножителя 21. Электрический сигнал затем усиливается 19 и поступает на осциллограф 18 или самопишущий потенциометр 20.

Вызывающий фотоиндуцированные изменения флуоресценции действующий свет от источника 17 (лампа накаливания 750 Вт) через тепловой фильтр 16, фокусирующие линзы 15, 12, светофильтр, выделяющий необходимую область фотовозбуждения 14, и фотозатвор 13 направляется на кювету с образцом поворотным зеркалом 11 под углом  $30^\circ$  к плоскости дна сосуда Дьюара.

Временные интервалы для действующего и измеряющего лучей регулируются фотозатворами, срабатывающими в среднем за 1,5—2 мс. Разрешающая способность установки составляет около 20 мс. Наличие двух монохроматоров позволяет варьировать длину волны возбуждения и исследовать флуоресценцию в широком спектральном диапазоне. Кроме того, это дает возможность использовать установку для измерения спектров флуоресценции и ее возбуждения.

Существуют другие конструкции приборов для исследования фотоиндуцированных изменений флуоресценции. Так, для регистрации индукции флуоресценции хлорофилла *a* фотосинтезирующих организмов, за которую, видимо, ответственна только часть общей флуоресценции, зависящая от эффективности фотосинтеза (т. е. «переменная» флуоресценция), Н. В. Карапетяном и В. В. Климовым была предложена установка с модуляцией измеряющего и действующего света. Поскольку изменения выхода флуоресценции, возбуждаемой слабым светом, обычно исследуют при освещении объекта действующим светом высокой интенсивности, измеряемая флуоресценция в значительной степени будет определяться фоновой флуоресценцией, которая возбуждается самим действующим потоком. Чтобы исключить влияние интенсивной фоновой флуоресценции, в установке предусмотрена модуляция измерительного света с частотой, отличающейся от частоты модуляции действующего света. Именно на частоту модуляции измеряющего луча и настроена регистрирующая система. Следует учесть также, что интенсивная фоновая флуоресценция вызывает переходные изменения чувствительности фотоумножителя, приводящие к искажению кинетики фотоиндуцированных изменений выхода флуоресценции. Для устранения таких артефактов обычно используют разделение во времени действующего и измеряющего световых потоков. Однако при этом измеряется только часть фотоиндуцированных изменений флуоресценции и, кроме того, действующий свет помимо флуоресценции будет возбуждать также и послесвечение объекта, что может вызвать нежелательные эффекты при регистрации кинетики.

Описанная ниже установка в значительной степени свободна от указанных недостатков. Принцип ее устройства заключается в том, что одновременно используются разделение измеряющего и действующего световых лучей во времени, их модуляция с различной частотой и регистрация только модулированного сигнала от измеряющего света. Установка является, по существу, модернизированным однолучевым дифференциальным спектрофотометром. Флуоресценция возбуждается монохроматическим светом низкой интенсивности, а изменения ее выхода вызываются освещением объекта действующим светом, направленным под углом  $90^\circ$  к измеряющему. Предусмотрено освещение объекта при необходимости двумя действующими световыми потоками, управление которыми осуществляется с помощью фотозатворов. На рис. 36 приведена схема такой установки.

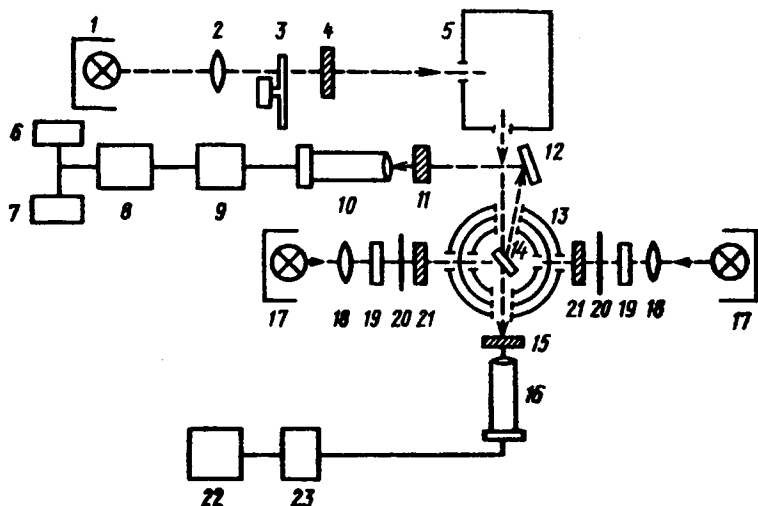


Рис. 36. Схема установки для измерения фотоиндуцированных изменений выхода флуоресценции (объяснение см. в тексте)

Измеряющий свет от источника 1 (лампа накаливания) через фокусирующую линзу 2 попадает на высокочастотный модулятор 3 (секторный вращающийся диск), а затем через стеклянный светофильтр 4 на входную щель монохроматора 5. Монохроматический луч света возбуждает флуоресценцию объекта, помещенного в плоскопараллельную кювету 14, расположенную под углом  $45^\circ$  к измеряемому и действующему лучу. Кювета находится во внутреннем неподвижном стакане фосфороскопа 13. Фосфороскоп представляет собой три коаксиальных цилиндра: внутренний и внешний цилиндры неподвижны и имеют четыре окна, расположенные через  $90^\circ$ , средний стакан вращается и имеет два окна — через  $180^\circ$ . Флуоресценция от объекта, возбуждаемая измеряющим светом, выделяется стеклянными светофильтрами 11, 15 и может регистрироваться либо на просвет с помощью фотоумножителя, расположенного за объектом 16, либо с передней стенки кюветы с помощью плоского зеркала 12 и другого фотоумножителя 10. В последнем случае влияние реабсорбции сказывается меньше.

Действующий свет, вызывающий фотоиндуцированные изменения, от источника 17 (лампа накаливания 750 Вт) попадает на кювету с образцом, проходя последовательно фокусирующую линзу 18, тепловой фильтр 19, фотозатвор 20 и светофильтр 21. Как уже отмечалось, можно использовать два источника действующего света. Модулированный сигнал от фотоумножителя поступает на узкополосный усилитель 9, настроенный на частоту модуляции измеряющего света (4,3 кГц), а затем выпрямляется 8 и регистрируется самописцем 7 или осциллографом 6. При другой схеме регистрации можно использовать самописец 22 и высокоомный вольтметр 23.

При работе фосфороскопа (измеряющий и действующий свет модулированы с одинаковой частотой) время освещения образца измерительным и действующим светом и темновой интервал между ними составляет 2,5 мс, а темновой интервал между двумя последовательными вспышками для каждого из световых потоков — 10 мс.

Применение фосфороскопа исключает попадание на фотокатод фотоумножителя рассеянного действующего света и фоновой флуоресценции. Дополнительную высокочастотную модуляцию измеряющего луча использовали для того, чтобы исключить влияние послесвечения, возбуждаемого действующим светом, на регистрацию изменений выхода флуоресценции. Постоянная времени установки при измерении фотондуцированных изменений флуоресценции в зависимости от экспериментальных условий составляла  $10^{-1}$  —  $10^{-2}$  с, а чувствительность — от 3 до 15 %.

Для измерения переменной флуоресценции фотосинтезирующих организмов на кафедре биофизики Биологического факультета МГУ был сконструирован импульсный флуорометр. Этот прибор позволяет регистрировать выход флуоресценции, который изменяется от минимального уровня  $F_0$  при открытых реакционных центрах (РЦ), возникающего вследствие потери части энергии возбуждения за время миграции к РЦ, до максимального уровня  $F_{\max}$  при закрытых РЦ вследствие восстановления первичного акцептора электронов. Переменная флуоресценция ( $F_o = F_{\max} - F_0$ ) в этих условиях позволяет судить о состоянии РЦ, скоростях восстановления акцепторов и других параметрах первичных реакций при фотосинтезе.

Принцип действия установки заключается в том, что объект освещается слабыми импульсами света, возбуждающими флуоресценцию на уровне  $F_0$ ; затем включается более интенсивный действующий свет в режиме постоянного горения (при этом к объекту обычно добавляют диурон — ингибитор электронного транспорта) и регистрируется максимальный уровень флуоресценции  $F_{\max}$ . Таким образом, поскольку измеряющим является импульсный свет и каждый импульс индуцирует флуоресценцию, которая регистрируется фотоумножителем, сопряженным с импульсным цифровым вольтметром и цифроаналоговым преобразователем, в условиях измерения  $F_{\max}$  энергия импульсного света, использовавшаяся при открытых РЦ для разделения зарядов, высвечивается в виде импульсов флуоресценции и прибор фиксирует максимальный уровень  $F_{\max}$ . После выключения действующего света происходит релаксация флуоресценции. На рис. 37 приведена схема установки.

Измеряющий свет от импульсного источника (лампы-вспышки 4, соединенной с блоком питания и управления 3) через фокусирующую линзу 5 и светофильтры 6 попадает в кюветное отделение — светонепроницаемую камеру, которая представляет собой неподвижный стакан 8 с внутренним коаксиальным цилиндрическим затвором 9. Входные и выходные окна расположены под углом  $90^\circ$ . Свет через входное окно попадает на кювету с образцом 10, закрепленную в кюветодержателе 11. Свет флуоресценции от объекта через систему светофильтров 12 попадает на фотокатод фотоумножителя 13. Сигнал от фотоумножителя регистрируется импульсным вольтметром 15, цифроаналоговым преобразователем 16 и поступает на самопишущий потенциометр 17. Фотоумножитель соединен с высоковольтным стабилизатором 14. Кюветодержатель имеет проточную систему и сопряжен с термостатом 7. В качестве действующего света применена галогенная лампа накали-

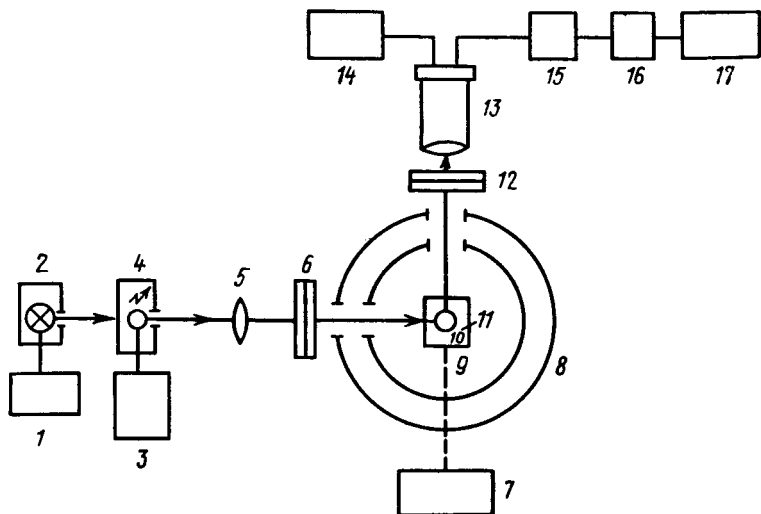


Рис. 37. Схема двухлучевого импульсного флуорометра (объяснение см. в тексте)

ванья 2 с источником постоянного тока 1. Действующий свет попадает в кюветное отделение через то же окно, что и измеряющий свет, который генерируется в режиме одиночных импульсов с заданной частотой следования и длительностью 40 мкс. Фотокатод фотоумножителя защищен от попадания на него измеряющего и действующего света с помощью красного светофильтра (КС-15), который скрещен со светофильтрами (СЗС-21, СС-4), пропускающими возбуждающий свет в синей области спектра.

**Метод фотоиндуцированной поляризации флуоресценции.** Для исследования динамических и структурных свойств макромолекул с успехом применяют метод фотоиндуцированной поляризации флуоресценции, который, так же как и метод фотодихроизма, основан на принципе фотоселекции, когда анизотропия пространственного распределения возбужденных молекул создается линейно поляризованным действующим светом. Излучение, таким образом, оказывается частично поляризованным. Вследствие броуновского движения молекул анизотропия со временем частично или полностью нарушается и излучающие молекулы вновь оказываются распределенными изотропно. Такой процесс, как было отмечено ранее, характеризуется значением времени вращательной релаксации  $\rho$ , зависящим от температуры и вязкости среды, а также от объема, формы и внутримолекулярной подвижности макромолекулы. Поляризация флуоресценции зависит также от интервала времени между поглощением света и его излучением. Таким образом, чем больше время жизни возбужденного состояния  $\tau$ , тем больше вероятность флуоресцирующей

щих молекул потерять свою ориентацию вследствие броуновского движения.

Различают два способа измерений поляризации: стационарный, позволяющий получить динамические характеристики макромолекул, усредненные по всему их ансамблю и по времени, и импульсный, дающий возможность разделить различные моды броуновского вращения макромолекулы и ее сегментов, которые вносят вклад в суммарную деполяризацию флуоресценции. При стационарном методе для возбуждения используют непрерывный пучок, при импульсном — короткую вспышку вертикально поляризованного света. Принципиальная основа этих методов изложена в § 5 гл. II.

Для исследования методом поляризации нефлуоресцирующих или слабофлуоресцирующих макромолекул используют флуоресцентные метки. В этом случае в соответствии с формулой Вебера

$$\frac{A_0}{A} = \frac{1/P - 1/3}{1/P_0 - 1/3} = 1 + \frac{3\tau}{\rho_h} = 1 + \frac{\tau}{\omega_h} \frac{T}{\eta},$$

где  $P$  и  $A$  — значения поляризации и анизотропии флуоресценции,  $P_0$  и  $A_0$  — предельные значения этих параметров в отсутствие броуновского вращения,  $\tau$  — время жизни флуоресценции метки,  $\eta$  — вязкость среды,  $T$  — абсолютная температура,  $\omega_h$  — коэффициент пропорциональности, зависящий от параметров макромолекулы,  $\rho_h$  — среднее гармоническое трех основных времён релаксации эллипсоида, которым аппроксимируется макромолекула, вокруг трех его осей.

Вывод этого уравнения основан на предположениях о том, что молекулы метки изотропно распределены по поверхности макромолекулы и жестко с ней связаны, а флуоресценция затухает по экспоненциальному закону. Поскольку в соответствии с уравнением Вебера наклон прямой в координатах  $1/P$  и  $T/\eta$  определяется соотношением  $\tau/\omega_h$ , то, измерив в независимом эксперименте величину  $\tau$ , можно вычислить значение  $\omega_h$  или  $\rho_h$  для данного отношения  $T/\eta$ , пользуясь графиком  $1/P = f(T/\eta)$ . Обычно вычисляют стандартное значение для  $T/\eta = 3,34 \cdot 10^4$  град/(Па·с), что соответствует водному раствору при 25 °С. Если метка имеет термально активируемое собственное вращение относительно макромолекулы, то в случае анизотропного и быстрого вращения метки можно рассматривать движения макромолекулы и метки отдельно и определять величину  $\rho_h$  с достаточной точностью из экспериментально полученных изотерм зависимости  $1/P$  от  $T/\eta$ .

Для непосредственного наблюдения временных зависимостей затухания флуоресценции  $F(t)$  и ее анизотропии  $A(t)$  используют импульсный метод поляризации флуоресценции. Эти зависимости представляют в виде суммы двух экспонент:

$$F(t) = F_0 (a_1 e^{-t/\tau_1} + a_2 e^{-t/\tau_2});$$

$$A(t) = A_0 (b_1 e^{-t/\varphi_1} + b_2 e^{-t/\varphi_2}),$$



где  $a_1, a_2, b_1, b_2$  — коэффициенты,  $\varphi$  — время вращательной корреляции,  $\tau$  — время жизни возбужденного состояния.

Время вращательной корреляции связано с временем вращательной релаксации соотношением  $\varphi = (1/3) \rho$ . Из экспериментальных данных определяют значения  $\varphi_1, \varphi_2, \tau_1, \tau_2$  и предэкспоненциальные коэффициенты. Эти вычисления обычно производят на ЭВМ методом моментов. В настоящее время описанные выше методы уже достаточно широко используют. Так, в Институте молекулярной биологии АН СССР (лаборатория физики биополимеров) методом поляризации флуоресценции подробно изучены динамические и структурные свойства иммуноглобулинов, что может иметь непосредственное отношение к выяснению механизмов функционирования иммунной системы и, в частности, механизмов биологической активности антител.

Измерение поляризации фотондуцированных изменений флуоресценции имеет большое значение для исследования структурно-функциональной организации фотосинтетического аппарата. Так, изучение *поляризации переменной флуоресценции* ориентированных клеток водорослей, хлоропластов, фотосинтетических мембран и пигмент-белковых комплексов дает информацию об ориентации дипольных моментов переходов пигмента реакционных центров и ближайших к нему антенных форм хлорофилла  $a$ . Показано, что эти переходы ориентированы практически параллельно плоскости фотосинтетической мембраны. Измерения поляризации переменной флуоресценции производят обычно на установках, предназначенных для регистрации фотондуцированных изменений флуоресценции с применением поляроидов. Более подробно это будет изложено при описании установки для исследования замедленной флуоресценции и фотондуцированных изменений быстрой флуоресценции в § 8.

## § 8. Методы измерения замедленной флуоресценции

При исследованиях первичных процессов фотосинтеза широко используют метод регистрации различных характеристик (кинетики, времени жизни, спектрального состава) замедленной флуоресценции (послесвечения). Длительное послесвечение фотосинтезирующих организмов можно отнести к индуцируемому свечению. Поскольку, как было показано, спектральный состав флуоресценции и послесвечения идентичен, излучение в процессах такого послесвечения обусловлено излучательной дезактивацией первого синглетного возбужденного состояния хлорофилла (т. е. переходом  $S_1^* \rightarrow S_0 + h\nu$ ).

Известно, что обычная флуоресценция затухает за времена порядка  $10^{-8}$  —  $10^{-9}$  с, тогда как послесвечение регистрируется в интервале от 0,5 мкс до нескольких минут. Таким образом, первое возбужденное синглетное состояние хлорофилла может генерировать

ся и после выключения возбуждающего света, по-видимому, в ходе обратных процессов рекомбинации. Позже было установлено, что возбужденное состояние  $S_1^*$  генерируется вследствие рекомбинации окисленного пигмента реакционного центра и восстановленного акцептора электронов ( $P^+ + Q^- \rightarrow P + Q + h\nu$ ). При этом источником замедленной флуоресценции являются молекулы хлорофилла *a* светособирающей антенны.

Отсюда следует, что *замедленная флуоресценция* в данном случае — это фотоиндуцированное излучение светособирающих молекул хлорофилла, возникающее за счет обратных реакций рекомбинации. Кинетика затухания послесвечения представляет собой экспоненциальную кривую, состоящую из нескольких компонентов с различными временами жизни, что объясняется существованием различных фотопродуктов. Превращения таких фотопродуктов можно зарегистрировать также с помощью метода низкотемпературной термолюминесценции. Не обсуждая подробно механизмы и природу замедленной флуоресценции, описанные достаточно детально в специальной литературе, важно подчеркнуть, что измерение послесвечения оказалось чрезвычайно информативным для изучения первичных процессов фотосинтеза.

Для измерения замедленной флуоресценции применяют установки различной конструкции, что определяется прежде всего временем жизни исследуемых компонентов. При регистрации долгоживущих компонентов со времени жизни в пределах 0,1—1 с используют проточные системы. Исследуемая суспензия хлоропластов или водорослей освещается действующим светом и перекачивается по светонепроницаемой трубке к фотоумножителю, который и регистрирует послесвечение. Интервал между освещением и измерением будет определяться в такой системе расстоянием от места освещения до фотокатода и скоростью потока. Для измерения еще более медленных компонентов послесвечения ( $\tau > 1$  с) существуют конструкции, позволяющие перемещать кювету с образцом от источника света к фотоумножителю. Так, если закрепить образец на внутреннем подвижном цилиндре, который закрыт сверху цилиндрическим кожухом с двумя окнами под углом  $180^\circ$  (одно — перед источником света, а другое — перед фотокатодом фотоумножителя), то при повороте такого цилиндра на  $180^\circ$  объект переместится от источника света к фотоумножителю, регистрирующему послесвечение. Интервал между освещением и измерением определяется в этом случае скоростью поворота внутреннего цилиндра.

В установках для регистрации короткоживущих компонентов послесвечения ( $\tau = 10^{-3} \div 10^{-2}$  с) используют фосфороскопические устройства (вращающийся цилиндр с окнами или секторные диски).

Блок-схема установки с цилиндрическим фосфороскопом представлена на рис. 38.



Благодаря системе двухканального усиления установка позволяет проводить измерения послесвечения как в стационарном режиме освещения, так и в случае быстрых переходных процессов, происходящих при включении или выключении возбуждающего света. В последнем случае в качестве источника света может быть использована также и импульсная лампа 2.

На кафедре биофизики Биологического факультета МГУ была сконструирована установка, позволяющая измерять как замедленную флуоресценцию, так и *фотоиндуцированные изменения быстрой флуоресценции*. Этот прибор представляет собой модифицированную установку с фосфороскопом для регистрации миллисекундного послесвечения, описанную выше.

В этой установке также применяется фосфороскоп, состоящий из трех коаксиальных цилиндров. Внутренний и внешний неподвижные цилиндры содержат по три окна: два входных для действующего и измеряющего света соответственно и одно выходное для регистрации быстрой или замедленной флуоресценции. Входное окно для измеряющего света расположено под углом  $180^\circ$ , а входное окно для действующего света—под углом  $115^\circ$  к выходному окну для регистрации. Средний цилиндр, являющийся модулятором, вращается с частотой 5000 об/мин (частота модуляции 220 Гц, темновой интервал 1,3 мс) и содержит восемь отверстий под углом  $45^\circ$  друг к другу.

Действующий свет применяют для возбуждения замедленной флуоресценции и генерации фотоиндуцированных изменений быстрой флуоресценции (например, переменной флуоресценции). Измеряющий свет используют для возбуждения быстрой флуоресценции. Входное окно фосфороскопа для измеряющего света и выходное окно открываются одновременно. Для того чтобы измерить фотоиндуцированные изменения быстрой флуоресценции и исключить при этом регистрацию замедленной флуоресценции, измеряющий и действующий лучи модулируются с различной частотой. Селективный усилитель настроен на частоту модуляции измеряющего луча (возбуждающего быструю флуоресценцию), которая осуществляется механическим дисковым модулятором света (частота модуляции 4900 Гц). Схема установки представлена на рис. 39.

Действующий свет от лампы накаливания с тепловым фильтром (интенсивность  $4 \cdot 10^{-3}$  Вт/см<sup>2</sup>) 1 или от стробоскопической лампы-вспышки (энергия импульса 4 Дж,  $\tau \approx 1$  мкс) 2 через фокусирующую линзу 3 и светофильтр 4 проходит через входное окно фосфороскопа и фокусируется второй линзой 5 на кювету с образцом 6, помещенную во внутренний цилиндр непосредственно перед выходным окном. Измерительный свет от другого источника 7 (лампа накаливания КГМ-75), фокусируясь линзой 8, попадает на дисковый модулятор света 9 или фотозатвор 10 (при использовании немодулированного света), проходит светофильтры 11, второе входное окно фосфороскопа 12, фокусируется линзой 13 на зеркало 14 и попадает на кювету с образцом. Излучаемый объектом свет флуоресценции или послесвечения (в зависимости от условий возбуждения) через светофильтр 16, перед которым при необходимости может быть помещен вращающийся поляризатор 15, попадает на фотокадод фотоумножителя 17.

Питание фотоумножителя осуществляется от высоковольтного стабилизатора 18. В систему питания лампы-вспышки входят источник питания 19, блок поджига 20 и синхронизации 21. Сигнал с фотоумножителя через пере-

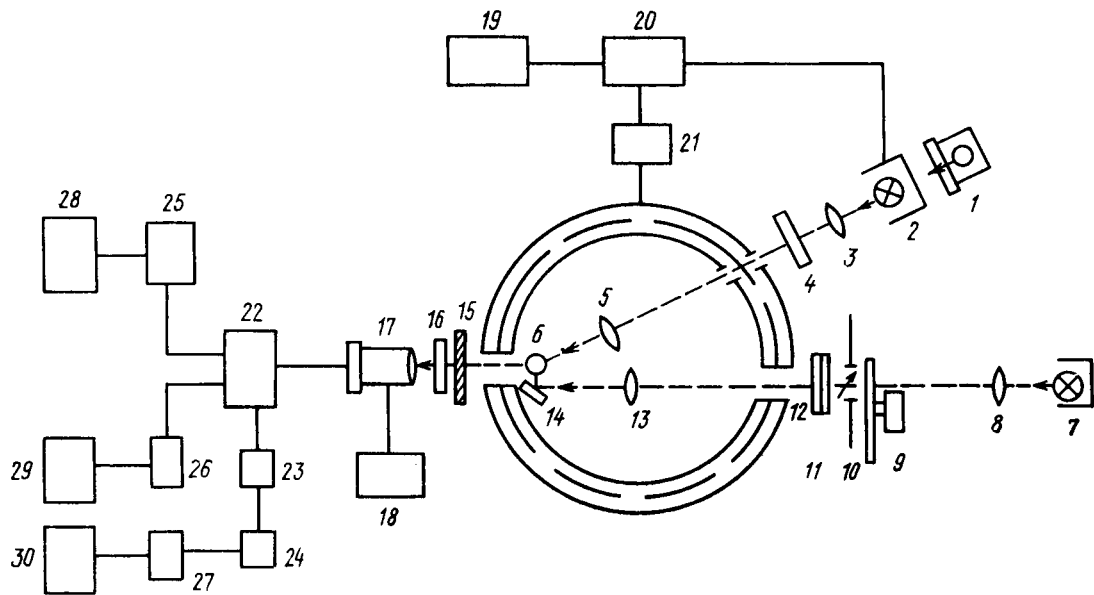


Рис. 39. Схема установки для раздельной регистрации замедленной флуоресценции и фотоиндуцированных изменений быстрой флуоресценции (объяснение см. в тексте)

ключатель режимов регистрации 22 поступает либо на селективный микровольтметр 23, настроенный на частоту 4900 Гц, затем на полосовой фильтр 24, выпрямитель 27 и самописец 30, либо на усилитель постоянного тока 26 и другой самописец 29. Сигнал после усиления 25 может регистрироваться также и осциллографом 28.

Первый канал регистрации предназначен для измерения фотондуцированных изменений быстрой флуоресценции — селективный усилитель, настроенный на частоту модуляции 4900 Гц (дисковый модулятор), отсекает сигнал от замедленной флуоресценции, который модулирован с частотой 220 Гц (фосфороскоп).

Второй канал регистрирует индукционные кривые замедленной флуоресценции при постоянном освещении объекта — сигнал попадает в усилитель постоянного тока.

Для регистрации затухания замедленной флуоресценции при импульсном освещении используют осциллограф с запоминающим устройством, сигнал на который поступает от усилителя переменного тока.

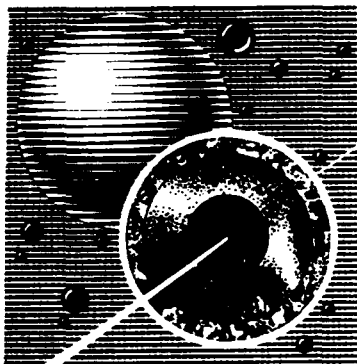
Установка может быть использована и для регистрации индукционных кривых быстрой флуоресценции. В этом случае измеряющий свет является одновременно и действующим, а вместо дискового модулятора используется фотозатвор (рис. 39).

С помощью данной установки можно также проводить измерение *поляризации быстрой и замедленной флуоресценции*. Для этого образцы (хлоропласты, фотосинтетические мембраны, клетки водорослей) предварительно ориентируют, а затем фиксируют (например, в полиакриламидном геле или при низкой температуре). Ориентированные образцы помещают в кювету, а после выходного окна фосфороскопа перед светофильтром располагают вращающийся поляроид 15. Замедленную или переменную быструю флуоресценцию измеряют по описанной выше схеме при двух положениях поляроида, соответствующих параллельной и перпендикулярной ориентации плоскости поляризации излучения относительно оси или плоскости ориентации исследуемого объекта (например, оси деформации геля или плоскости фотосинтетических мембран).

Такой метод позволяет получить информацию об ориентации дипольных моментов перехода фотоактивного пигмента реакционных центров, и ближайших к ним антенных форм хлорофилла *a*, испускающих замедленную и переменную флуоресценцию. Так, для фотосистемы II высших растений и водорослей установлено, что дипольный момент перехода пигмента реакционного центра  $P_{880}$  ориентирован практически параллельно плоскости фотосинтетической мембраны, а ближайший к нему антенный компонент хлорофилла *a*, участвующий в замедленной и переменной флуоресценции, излучает около 685—686 нм с ориентацией осциллятора, также параллельной плоскости мембраны.

### Глава III

## Лазерная спектроскопия



Фотобиологические реакции, к которым относится, в частности, фотосинтез, инициируются светом, поглощаемым молекулами пигментов. Процессами, исследуемыми *пикосекундной* и *наносекундной лазерной спектроскопией*, являются миграция энергии по пигментным молекулам, захват возбуждения фотоактивными реакционными центрами (ФРЦ), разделение зарядов в последних, перенос электрона по электрон-транспортной цепи. Диапазон скоростей этих процессов довольно широк —  $10^{-12}$  —  $10^1$  с; их исследование требует соответствующего аппаратного обеспечения.

Как правило, пигментные комплексы (ПК), обеспечивающие энергией электронного возбуждения ФРЦ, являются образованиями, интенсивно поглощающими свет видимого диапазона спектра. Поэтому поглощение одного или нескольких фотонов и реализация одного или нескольких возбужденных состояний ПК не вызывает заметных изменений в его спектре поглощения. С другой стороны, квантовые выходы флуоресценции молекул ПК, как правило, значительны и достигают 0,1—0,01. Поэтому изучение миграции энергии по молекулам ПК проводят главным образом методом пикосекундной флуорометрии.

В результате многочисленных актов переноса электронное возбуждение, возникшее в ПК, захватывается ФРЦ, так что его фотоактивный пигмент переходит в возбужденное состояние. Непосредственно после локализации возбуждения на фотоактивном пигменте ФРЦ за время  $\gtrsim 10^{-11}$  с происходит разделение зарядов: отрыв электрона от возбужденной молекулы — донора и перенос его на первичный акцептор.

Как правило, ФРЦ представляет собой пигмент-белковое образование существенно меньших размеров, чем ПК, и содержит 2—6 молекул пигмента. В результате разделения зарядов в ФРЦ возникают два радикала, спектры поглощения которых сильно отличаются от спектров исходных молекул. Поэтому проводить исследование реакции разделения зарядов в ФРЦ предпочтительнее методом пикосекундной абсорбционной спектроскопии. Хотя квантовый выход флуоресценции фотоактивного пигмента ФРЦ низок ( $\leq 10^{-4}$ ) и прямая регистрация кинетики флуоресценции сопряжена со значительными трудностями, метод импульсной пикосекундной флуорометрии также является информативным инструментом в изучении разделения и первичной стабилизации зарядов в ФРЦ.

Дальнейший перенос электрона по электрон-транспортной цепи ФРЦ вообще не сопровождается флуоресценцией, поэтому абсорбционные спектрометры пикосекундного и более медленного диапазонов (в совокупности с методами магнитного резонанса) — абсолютный необходимый инструмент в изучении этого процесса.

На каждом этапе локализации электрона на переносчиках в ФРЦ возможна рекомбинация разделенных зарядов, в результате чего вновь возбуждается возбужденное состояние фотоактивного пигмента. Это возбуждение с определенной вероятностью возвращается в ПК и высвечивается в виде флуоресценции ПК, сам фотоактивный возбужденный пигмент может перейти в основное состояние с испусканием кванта света или в нем произойдет разделение зарядов. Ясно, что рекомбинацию зарядов в ФРЦ можно исследовать как методом пикосекундной флуорометрии, так и методом абсорбционной спектроскопии.

Таким образом, пикосекундную флуорометрию используют при исследовании миграции энергии в ПК, захвата возбуждения ФРЦ, возврата его из ФРЦ в ПК, разделения зарядов и рекомбинации разделенных зарядов. Абсорбционная спектроскопия необходима для изучения реакции разделения и рекомбинации зарядов, а также последующего переноса электрона по электрон-транспортной цепи ФРЦ.

К методам лазерной спектроскопии относится также *спектроскопия комбинационного рассеяния* (КР), с помощью которой можно исследовать природу межмолекулярных взаимодействий.

В основе метода КР лежит явление неупругого рассеяния света молекулами исследуемого вещества. При этом если образец возбуждается монохроматическим излучением с частотой  $\omega_0$ , то за счет неупругого взаимодействия света с молекулами образца часть энергии возбуждающего излучения рассеивается в виде излучения, спектр которого является суперпозицией колебаний всех типов молекул исследуемой системы. Иными словами, спектр рассеянного излучения представлен набором линий  $\omega_0$ ,  $\omega_0 \pm \omega_i$ , где  $\omega_i$  — частоты нормальных колебаний молекулы.

В свою очередь, частоты нормальных колебаний молекулы (набор колебательных мод определенного электронного уровня)



зависят от природы межмолекулярных взаимодействий, в которые вступает исследуемая молекула. Именно поэтому спектроскопия КР как средство тонкого исследования природы межмолекулярных взаимодействий органических и неорганических молекул привлекает внимание ученых различных специальностей.

В настоящее время существует несколько разновидностей спектроскопии КР. При возбуждении излучением с частотой, не попадающей в полосы поглощения молекул, наблюдается спонтанное КР, интенсивность которого составляет  $10^{-8}$  —  $10^{-10}$  от интенсивности возбуждающего света. При попадании частоты возбуждающего излучения в полосу поглощения интенсивность линий в спектре КР тех атомов и групп молекул, чей вибранный переход оказывается в резонансе, усиливается (в  $10^3$  —  $10^6$  раз). Это явление названо *резонансным комбинационным рассеянием (РКР)*.

В последние годы реализована возможность записи полного спектра КР за короткие, вплоть до  $10^{-12}$  с, интервалы времени при импульсном возбуждении молекул. Такая разновидность спектроскопии КР называется *динамическим КР*.

Ниже будут подробно описаны основы метода спектроскопии КР и используемые экспериментальные установки. Но вначале необходимо рассмотреть основные сведения о лазерах.

Обычно лазеры классифицируют по типу лазерного материала и методу создания инверсной населенности в активной среде. Лазеры работают как в непрерывном, так и в импульсном режимах. В импульсном режиме достигаются наибольшие значения мощности излучения. Можно выделить *три типа импульсных режимов*.

1. *Нормальный режим, или режим свободной генерации*. В этом случае электрический импульс подается на импульсную лампу накачки (твердотельный лазер) или на плазменную трубку (газовые лазеры). Длительность импульса в этом режиме меняется от  $10^{-3}$  до  $10^{-5}$  с, а пиковая мощность может достигать десятков мегаватт.

2. *Режим модуляции добротности*, при котором для получения мощного короткого импульса света используют ячейку Погкельса (вращение плоскости поляризации под действием электрического поля) или насыщающиеся поглотители. Длительность импульса в таких лазерах составляет  $10^{-7}$  —  $10^{-8}$  с, пиковая мощность достигает 100 МВт.

3. *Режим синхронизации мод* основан на перераспределении энергии электромагнитной волны внутри резонатора между пространственно сближенными частотными компонентами, что приводит к формированию ультракоротких импульсов. Длительность импульса составляет  $100 \text{ фс} \div 1 \text{ нс}$ , мощность —  $10^8$  —  $10^{12}$  Вт.

В электрическом разряде инверсия населенностей возникает в результате возбуждения атомов или молекул электронным ударом. Примерами газовых лазеров могут служить гелий-неоновый лазер ( $\lambda = 0,6; 1,1; 3,4 \text{ мкм}$ ), аргоновый лазер ( $\lambda = 0,5 \text{ мкм}$ ) и  $\text{CO}_2$ -лазер ( $\lambda = 10 \text{ мкм}$ ).

В полупроводниках при инжекции неосновных носителей создается инверсия населенности в тонком переходном слое, расположенном между двумя областями полупроводникового кристалла, — область с повышенным содержанием электронов (*n*-область) и «дырок» (*p*-область).

В химических лазерах источником инверсной населенности является химическая реакция, в результате которой образуются атомы, молекулы или химические радикалы в возбужденном состоянии. Наиболее распространенным химическим лазером является лазер, в котором в качестве рабочего вещества используется  $\text{CF}_3\text{I}$ . Энергия в импульсе такого лазера составляет сотни джоулей.

В лазере на органических красителях используется широкая полоса люминесценции этих веществ; диспергирующий элемент (призма или дифракционная решетка), выделяя необходимый спектральный участок, производит перестройку частоты излучения. В параметрических генераторах света применяют анизотропные кристаллы, в которых в результате нелинейно-оптического преобразования происходит изменение длины волны возбуждающего света в зависимости от ориентации кристалла.

Таким образом, современные оптические квантовые генераторы позволяют получать монохроматическое слаборасходящееся мощное излучение почти во всех участках электромагнитной шкалы, начиная от  $\gamma$ -излучения до глубокого ИК-диапазона

## § 1. Основы метода импульсной флуорометрии

С момента получения пикосекундных ( $10^{-12}$  с) импульсов света Г. В. Моккером и Р. Дж. Коллинзом (1965) от рубинового лазера и А. Дж. Де Марией (1966) от неодимового лазера техника их генерации непрерывно совершенствовалась. К настоящему времени методы генерации достигли такого уровня, что стало возможным надежное получение импульсов, длительность которых определяется обратной шириной спектра излучения активных молекул. Так, рубиновый лазер генерирует импульсы длительностью  $\sim 30$  пс, лазер на фосфатном стекле с неодимом  $\sim 1$  пс, квазинепрерывные лазеры на красителях  $\sim 0,3$  пс. Процессы синхронизации мод, при которых на выходе лазера получается последовательность импульсов свега пикосекундной длительности, детально исследованы экспериментально и теоретически описаны в целом ряде общедоступных обзоров.

Интенсивное развитие техники и теории генерации сверхкоротких световых импульсов определяется тем, что эти импульсы предоставляют уникальные возможности в изучении процессов, происходящих при взаимодействии света с веществом и протекающих за  $10^{-12}$  —  $10^{-9}$  с. Осуществление этих исследований потребовало развития традиционных методов динамической спектроскопии (абсорбционной и флуорометрии) до качественно нового уровня;

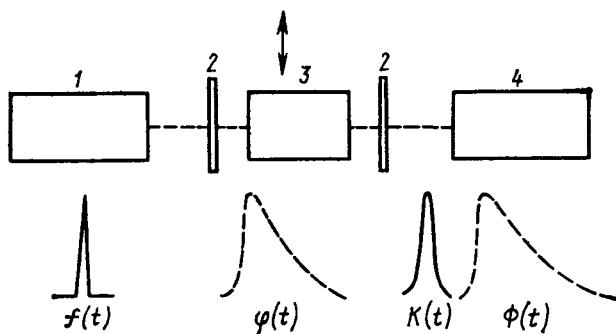


Рис. 40. Схема метода импульсной флуорометрии:

1 — импульсный источник света, 2 — светофильтры, 3 — образец, 4 — регистратор;  $f(t)$  — возбуждающий импульс света,  $\varphi(t)$  — характеристическая функция флуоресценции,  $K(t)$  — аппаратная характеристическая функция,  $\Phi(t)$  — регистрируемый сигнал

возникли новые методы исследования с пикосекундным разрешением.

*Импульсная флуорометрия* представляет собой метод прямого наблюдения кинетики затухания флуоресценции. При этом короткий, достаточно мощный импульс света, попадая на образец, создает высокую концентрацию возбужденных состояний исследуемых молекул, радиационная дезактивация которых во времени регистрируется фотоприемниками. Следовательно, основными элементами импульсного флуорометра являются источник света для возбуждения флуоресценции, светофильтры или иные селективирующие спектр приборы и система регистрации (рис. 40).

Флуоресценция возбуждается импульсом света  $f(t)$ , длительность которого выбирается меньше времени жизни флуоресцентного состояния исследуемых молекул. В основе анализа регистрируемого сигнала флуоресценции лежат представления об аппаратной и характеристической функциях. Аппаратная характеристическая функция (АХФ)  $K(t)$  определяется как частотной характеристикой системы регистрации, так и параметрами возбуждающего импульса  $f(t)$ . Вид АХФ легко установить, если на вход системы регистрации подать импульс света от источника возбуждения и зарегистрировать сигнал на выходе.

При измерении длительности флуоресценции на выходе регистрирующей системы детектируется сигнал  $\Phi(t)$ , который можно представить в виде свертки характеристической функции флуоресценции  $\varphi(t)$ , определяемой как интенсивность флуоресценции, возбуждаемой в момент времени  $t = 0$   $\delta$ -образным импульсом света, и АХФ  $K(t)$ :

$$\Phi(t) = \int_{-\infty}^{+\infty} K(t-t') \varphi(t') dt'. \quad (\text{III.1.1})$$

Таким образом, экспериментально измеряемыми являются функции  $K(t)$  и  $\Phi(t)$ , тогда как в действительности необходимо определение функций  $\varphi(t)$ . К сожалению, никакого удобного аналитического метода нахождения функции  $\varphi(t)$  по экспериментально наблюдаемым  $K(t)$  и  $\Phi(t)$  не существует и на практике используют различные приближения.

Если АХФ  $K(t)$  можно считать  $\delta$ -функцией по отношению к  $\Phi(t)$ , то уравнение (III.1.1) легко упрощается:

$$\Phi(t) = \int_{-\infty}^{+\infty} K(t-t') \varphi(t') dt' = \int_{-\infty}^{+\infty} \delta(t-t') \varphi(t') dt' = \varphi(t).$$

Иными словами, регистрируемый сигнал  $\Phi(t)$  является *характеристической функцией флуоресценции* и обработка результатов измерений крайне проста.

В том случае, когда длительности АХФ и флуоресцентной характеристической функции сравнимы, нахождение  $\varphi(t)$  по  $K(t)$  и  $\Phi(t)$  более трудоемко. Рассмотрим процедуру определения  $\varphi(t)$ , для случая, когда ее можно представить в виде суммы экспонент:

$$\varphi^c(t) = \Theta(t) \sum_{k=1}^m A_k e^{-t/\tau_k}; \quad \Theta(t) = \begin{cases} 0, & t \leq 0, \\ 1, & t > 0, \end{cases} \quad (\text{III.1.2})$$

где  $A_k$  и  $\tau_k$  — искомые параметры,  $m$  — число компонентов. В этом случае модельная кинетика определяется следующим образом:

$$\Phi^c(A_k, \tau_k) = \int_{-\infty}^{+\infty} K(t-t') \varphi^c(t') dt'. \quad (\text{III.1.3})$$

Введем функционал среднеквадратичной ошибки

$$F = \sum_{i=1}^N d_i^2; \quad d_i = \Phi_i^{\text{эксп}} - \Phi_i^c(A_k, \tau_k), \quad (\text{III.1.4})$$

где  $\Phi_i^{\text{эксп}}$  — экспериментальные значения функции  $\Phi(t)$ , получаемые из измеренных кривых в момент времени  $t = i$ ; в эти же моменты времени  $\Phi_i^c(A_k, \tau_k)$  — значения модельной кривой.

Алгоритм подбора модельной кинетики основан на минимизации функционала среднеквадратичной ошибки, который представляет собой сложную функцию параметров  $A_k$  и  $\tau_k$ ,  $k = 1, \dots, m$ , где  $m$  — число компонентов.

Существует много способов минимизации функционалов, зависящих от нескольких переменных. Один из вариантов обобщенного метода Ньютона — *метод затухающих наименьших квадратов Левенберга* — обеспечивает, с одной стороны, высокую сходимость, а с другой — обладает высокой устойчивостью к неточности задания

начальных значений параметров, так как при приближении к минимуму вариации параметров затухают.

На начальном этапе решения задачи в память машины вводят экспериментальную кинетику, аппаратную функцию, число компонентов  $m$ , начальные значения параметров  $A_k, \tau_k, k = 1, \dots, m$ . При этом число компонентов выбирают с учетом априорных данных об исследуемой системе; в процессе вычислений параметры можно фиксировать, что полезно при подборе начального приближения. Вычисления производят до тех пор, пока функционал среднеквадратичной ошибки не станет меньше величины, характеризующей норму ошибок эксперимента.

## § 2. Метод пикосекундной абсорбционной спектроскопии

В основе метода динамической абсорбционной спектроскопии лежит использование двух коротких импульсов света, с помощью которых изучают изменение оптической плотности образца (рис. 41). Один из импульсов  $U_{\text{в}}$ , имеющий достаточную мощность, называется *возбуждающим* и служит для инициирования изменения абсорбционных характеристик образца. Другой, более слабый по интенсивности, является *зондирующим* и используется для регистрации изменений спектров поглощения, вызванных возбуждающим импульсом. Как правило, зондирующий импульс делят на два: *пробный* и *импульс сравнения*, — которые проходят через разные участки исследуемого образца. Пробный импульс распространяется через область, в которой исследуется возмущение оптической плотности, вызванное возбуждающим импульсом; импульс сравнения посылается через невозмущенную область.

На интенсивности импульсов, используемых в абсорбционной спектроскопии, накладываются определенные ограничения. Интенсивность возбуждающего импульса не должна превышать пороговую для нелинейных эффектов (аннигиляция, многоквантовые процессы), однако она должна быть достаточной, чтобы вызвать ощу-

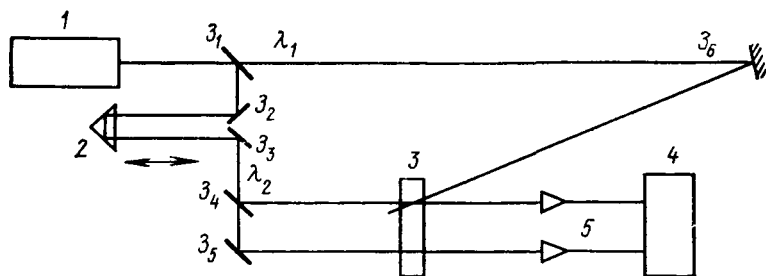


Рис. 41. Схема метода дифференциальной абсорбционной спектроскопии: 1 — импульсный источник света, 2 — линза задержки, 3 — образец, 4 — регистратор, 5 — фотодиоды,  $\lambda_1$  и  $\lambda_2$  — возбуждающий и зондирующий свет, З<sub>1</sub>—З<sub>6</sub> — зеркала.

тимые изменения в спектре поглощения. Интенсивность зондирующего импульса должна быть настолько низкой, чтобы вызываемые им изменения поглощения были незначительны по сравнению с изменениями, обусловленными возбуждающим импульсом. Однако интенсивность зондирующего импульса должна быть достаточной, чтобы в эксперименте надежно регистрировать его изменения.

В настоящее время сформировались *два основных подхода* в пикосекундных абсорбционных измерениях. В одном из них используют два импульса света с фиксированными длинами волн, однако время прихода зондирующего импульса относительно возбуждающего может варьироваться в широких пределах. Такая модификация абсорбционного спектрометра позволяет измерять кинетику возникновения и исчезновения полосы поглощения, возникшей в результате поглощения мощного импульса возбуждающего света.

Другой подход в пикосекундной абсорбционной спектроскопии связан с реализацией возможности построения мгновенных спектров поглощения исследуемого соединения. В этих опытах также используют два импульса света: возбуждающий (с определенной либо перестраиваемой длиной волны) и зондирующий (представленный широкой спектральной полосой излучения). При этих измерениях варьируется временная задержка между двумя импульсами. При такой постановке экспериментатор будет регистрировать спектр поглощения исследуемого соединения спустя  $\Delta t$  после возбуждения. В результате можно будет определить спектр поглощения соединений, участвующих в неких темновых реакциях (например, в реакциях переноса электрона), и установить последовательность переносчиков и их природу.

Каким образом измеряют изменения оптической плотности образца, индуцированные лазерным импульсом? Как видно из рис. 41, в дифференциальном абсорбционном спектрометре измеряемыми величинами являются энергия пробного импульса и энергия импульса сравнения. Так как интенсивность лазерного импульса нестабильна от вспышки к вспышке, то в эксперименте измеряется отношение энергии импульса сравнения и пробного. Для непрерывной привязки результатов к нулевому уровню последовательно регистрируется отношение энергии импульсов сравнения и пробного в присутствии возбуждающего импульса и без него.

Пусть  $U_1$ ,  $U_2$  и  $U_1^*$ ,  $U_2^*$  — энергия импульсов сравнения и пробного в отсутствие и при наличии возбуждающего импульса соответственно. Изменение оптической плотности будет определяться следующим выражением:

$$\Delta A = \lg (U_2 U_1^* / U_1 U_2^*).$$

Очевидно, основным источником погрешностей в определении  $\Delta A$  является непостоянство отношения энергии импульсов сравнения и пробного. Для уменьшения величины погрешности обычно вводят автоматический отбор лазерных импульсов по энергии. При этом,

если значения энергии возбуждающего и пробного импульсов не попадают в наперед заданные энергетические ворота, эти экспериментальные данные не используются в расчетах. Кроме того, в реальном опыте осуществляется накопление и усреднение экспериментальных данных, что при  $N$  накоплениях в  $\sqrt{N}$  раз увеличивает точность определения  $\Delta A$ .

Ошибка в определении изменения оптической плотности  $\Delta A$  при  $N$  накоплениях определяется следующим выражением:

$$S(A) = \left( \frac{\delta T}{\bar{T}} + \frac{\delta T^*}{\bar{T}^*} \right) \lg e,$$

где 
$$\frac{\delta T}{\bar{T}} = \sqrt{\left\{ \frac{S_1^2}{(\bar{U}_1)^2} + \frac{S_2^2}{(\bar{U}_2)^2} - 2q_{12} \frac{S_1}{\bar{U}_1} \frac{S_2}{\bar{U}_2} \right\} \frac{1}{N-1}};$$
  

$$\bar{T} = \frac{\sum U_{1i}}{\sum U_{2i}} - \text{среднее значение оптического пропускания};$$

$$S_{1(2)}^2 = \frac{1}{N-1} \left\{ \sum \frac{U_{1(2)i}^2}{N} - \frac{1}{N^2} (\sum U_{1(2)i})^2 \right\};$$

$$q_{12} = \frac{1}{N} \frac{\sum (U_{1i} - \bar{U}_1)(U_{2i} - \bar{U}_2)}{S_1 S_2};$$

$\bar{U}_1$ ,  $\bar{U}_2$ ,  $\bar{U}_1^*$  и  $\bar{U}_2^*$  — усредненные за  $N$  накоплений энергии импульсов сравнения и пробного в отсутствие и при наличии возбуждающих импульсов соответственно;  $q_{12}$  — коэффициент корреляции.

Обычно во время измерений задаются пределы флуктуации энергии возбуждающего и зондирующего импульсов, а также либо число накоплений  $N$ , либо точность измерения  $\Delta A$ . Для того чтобы уменьшить влияние нестабильности длительности лазерных импульсов ( $\Delta t$ ), ухудшающих временное разрешение спектрометра, разработан метод автоматической селекции лазерных импульсов по длительности.

### § 3. Способ селекции лазерных импульсов по длительности

Способ относительного контроля изменения длительности пикосекундных импульсов и их отбора в заданных пределах основан на нелинейном оптическом эффекте генерации второй гармоники. Использование этого метода стало возможным благодаря созданию автоматизированной системы управления и сбора информации в абсорбционном спектрометре на базе микропроцессорной техники.

Интенсивность второй гармоники для пучка света с гауссовым профилем в поперечном сечении, если пренебречь истощением и обратной реакцией второй гармоники на накачку (коэффициент преоб-

разования во вторую гармонику  $\leq 3\%$ ), будет определяться выражением

$$P^{2\omega} = 2 \left( \frac{\mu_0}{\epsilon_0} \right)^{3/2} \frac{\omega^2 d_{\text{эф}}^2 I^2 (P^\omega)^2 \sin^2 \left( \frac{\Delta k l}{2} \right)}{n^3 \pi \rho_0^2 \left( \frac{\Delta k l}{2} \right)^2}. \quad (\text{III.3.1})$$

Здесь  $\rho_0$  — радиус пучка;  $l$  — длина кристалла;  $\Delta k = k_2 - 2k_1$  — фазовая расстройка;  $\mu_0, \epsilon_0$  — магнитная и электрическая постоянные;  $\omega$  — циклическая частота электромагнитной волны излучения второй гармоники лазера;  $d_{\text{эф}}$  — эффективное значение тензора;  $P^\omega$  — мощность возбуждающего света;  $n$  — показатель преломления.

Временной профиль пикосекундного импульса, получаемого на выходе лазера с самосинхронизацией мод, можно описать функцией Гаусса:

$$P(t) = P_{0\text{exp}} \exp(-t^2/\tau^2), \quad (\text{III.3.2})$$

где  $\tau$  — длительность импульса по полувысоте.

Учитывая, что регистрируемая фотоприемниками энергия будет определяться как

$$E = P_0 \int_{-\infty}^{\infty} \exp(-t^2/\tau^2) dt = P_0 \sqrt{\pi} \tau, \quad (\text{III.3.3})$$

можно получить следующее соотношение:

$$\frac{M(E^\omega)^2}{\sqrt{2\pi} E^{2\omega}} = \tau,$$

где  $M$  с учетом (III.3.1) определяется из соотношения

$$M = P^{2\omega}/(P^\omega)^2. \quad (\text{III.3.4})$$

Таким образом, измеряя величины  $E^\omega$  и  $E^{2\omega}$ , можно контролировать относительное изменение  $\tau$  и вводить отбор по длительности импульса в процессе эксперимента. Соотношение (III.3.4) справедливо в том случае, если длительность импульса основной частоты  $\tau_\omega$  равна длительности импульса второй гармоники  $\tau_{2\omega}$ .

Из приведенных данных можно сделать вывод, что, используя генератор второй гармоники на кристалле дигидрофосфата калия KDP в одномодовом пучке, можно при наличии автоматизированной системы вводить отбор по длительности пикосекундного импульса.

Относительная величина флуктуации энергии зондирующего импульса определяется следующим выражением:

$$\delta U_n/U_n = (2\gamma + \beta) \exp[(-t^2/2\tau^2)(1 - 2\beta)],$$



где  $\gamma = \delta P_0 / P_0$ ;  $\beta = \delta t / t$ ;  $\delta t$  и  $\delta P_0$  — флуктуации длительности и мощности лазерного импульса;  $t$  — время задержки между возбуждающим и зондирующим импульсами [предполагают, что  $\Phi(t) = \delta(t)$ ]. Найденная зависимость показывает, что наибольшее влияние параметров лазерных импульсов сказывается в момент совпадения во времени возбуждающего и зондирующего импульсов, а относительная ошибка измерения энергии зондирующего импульса в большей степени зависит от флуктуации длительности световых импульсов, поэтому отбор по длительности лазерного импульса будет в этом случае более эффективен.

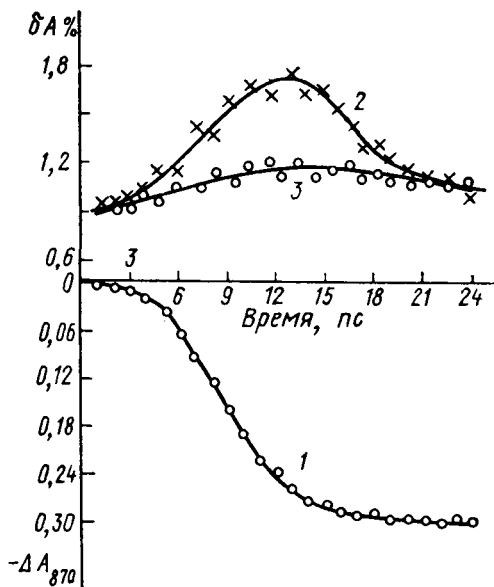


Рис. 42. Кинетика выцветания полосы 870 нм в реакционных центрах *Rhodospseudomonas sphaeroides* (1) и зависимости величин абсолютной ошибки измерений от временной задержки между возбуждающим и зондирующим импульсами без отбора по длительности (2) и с отбором (3)

На рис. 42 (1) представлена кинетика выцветания полосы 870 нм в реакционных центрах *Rhodospseudomonas sphaeroides*, отражающая переход  $P_{870} \rightarrow P_{870}^*$ , который протекает за время  $\leq 1$  пс. Временное разрешение абсорбционного спектрометра для определенной длительности импульса и величины выцветания пропорционально точности измерений. В частности, для достижения временного разрешения в 3 пс необходимо, чтобы относительная ошибка для кинетической кривой не превышала 0,01 по уровню 0,5 от максимальной величины изменения оптической плотности.

Экспериментальные исследования величины абсолютной ошибки при измерении кинетики выцветания в реакционных центрах показывают (рис. 42, 2), что абсолютная ошибка достигает максимума при совпадении во времени возбуждающего и зондирующего импульсов, т. е. в тот период времени, когда наиболее сильно сказываются флуктуации длительности световых импульсов. При увеличении задержки между импульсами ошибки в основном определяются флуктуациями интенсивности возбуждающего импульса. Величина ошибки в начале кинетической кривой обусловлена главным образом погрешностями измерительной системы.

Аналогичная зависимость ошибок при наличии отбора по длительности импульсов показана на рис. 42 (3). Видно, что величина ошибок значительно уменьшилась на фронте кинетики выцветания, т. е. когда отклик образца на возбуждающий импульс соизмерим или меньше длительности импульса. В этом случае введение отбора по длительности эффективно повышает точность измерения кинетической кривой, а следовательно, и временное разрешение спектрометра.

#### § 4. Пикосекундный импульсный флуорометр

Рассмотренные выше общие принципы метода импульсной флуориметрии позволяют сформулировать наиболее важные критерии, которыми следует руководствоваться при создании современного флуорометра. Наиболее важными характеристиками прибора являются следующие.

**Временное разрешение.** Общеизвестно, что флуоресценция испускается молекулой при ее излучательном переходе с первого синглетно возбужденного состояния в основное ( $S_1 \rightarrow S_0$ -переход). Время этого перехода (время жизни  $S_1$ -состояния) определяется как свойствами исследуемой молекулы, так и внешними условиями, в которых эта молекула находится. Так, в растворах низкой концентрации ( $< 10^{-5}$  М) время жизни  $S_1$ -состояния красителей и пигментов, как правило, составляет единицы наносекунд. В концентрированных растворах красителей или в нативных биологических системах, где реализуются значительные межмолекулярные взаимодействия, время жизни  $S_1$ -состояния сокращается в десятки или даже сотни раз и может достигать нескольких пикосекунд. Следовательно, временное разрешение современного флуорометра должно обеспечивать измерение длительности световых импульсов порядка  $10^{-12}$  с. Так как временное разрешение прибора определяется длительностью возбуждающего импульса и частотой характеристикой системы регистрации, импульсный флуорометр должен быть снабжен источником пикосекундных импульсов света необходимого спектрального диапазона и устройствами, способными измерять световые сигналы пикосекундной длительности.

**Чувствительность системы регистрации.** Сокращение времени жизни  $\tau$   $S_1$ -состояния пигментов в нативных биологических системах по сравнению с  $\tau_0$   $S_1$ -состояния низкоконцентрированных растворов этих же пигментов, как правило, обусловлено эффективной миграцией энергии между молекулами, а также фотореакциями, в которые вступает возбужденная молекула. Эти процессы, естественно, конкурируют с флуоресценцией и значительно уменьшают ее длительность и квантовый выход. Например, квантовый выход флуоресценции хлорофилла *in vitro* при концентрации  $\leq 10^{-5}$  М составляет  $\sim 0,32$ , тогда как *in vivo* (целые хлоропласты) не превышает  $\sim 0,02$ ; наконец, выход флуоресценции Хл *a* реакционного

центра составляет величину порядка  $10^{-3} - 10^{-4}$ . Следовательно, система регистрации должна обладать пикосекундным временным разрешением и обеспечивать измерение флуоресценции, испускаемой с квантовым выходом  $\sim 10^{-4}$ .

Интенсивность флуоресценции в известных пределах пропорциональна интенсивности возбуждающего импульса. Поэтому, на первый взгляд, абсолютный поток флуоресценции можно увеличить, повысив мощность возбуждения. В действительности сама исследуемая система накладывает серьезные ограничения на допустимые мощности возбуждающих световых импульсов. Так, при интенсивностях пикосекундных импульсов света больше  $10^6 - 10^8$  Вт/см<sup>2</sup> могут реализовываться такие нелинейные явления, как синглет-синглетная аннигиляция, двухквантовые процессы и др., которые приводят к сокращению длительности флуоресценции и падению ее квантового выхода. Кроме того, при превышении определенных пороговых мощностей возбуждения наблюдается разрушение пигментированных биологических структур как следствие локального перегрева образца, развития ударных волн и т. д. Следовательно, условия эксперимента накладывают строгие ограничения на интенсивность лазерных импульсов, используемых для измерения неискаленных значений  $\tau$ . Оказывается, что с учетом выхода флуоресценции ( $10^{-2} - 10^{-3}$ ) и геометрии светосбора чувствительность системы регистрации должна обеспечивать регистрацию световых потоков  $10^9 - 10^{10}$  квант/см<sup>2</sup>.

**Линейность и динамический диапазон.** Под линейностью системы регистрации понимают диапазон изменения интенсивности света на входе системы регистрации, при котором сигнал (световой или электрический) на выходе изменяется пропорционально входному. Динамический диапазон определяют отношением максимально регистрируемой без искажения интенсивности импульса к минимальной на линейном участке характеристики свет/сигнал системы регистрации. Определение этих характеристик необходимо проводить для каждой конкретной системы регистрации, чтобы корректно измерять длительность и кинетику затухания флуоресценции.

**Спектральная чувствительность.** Эта характеристика флуорометра определяется совокупностью спектрального диапазона длин волн возбуждения и спектральной чувствительностью системы регистрации. Как правило, спектральную чувствительность флуорометра считают удовлетворительной, если имеется возможность возбуждать флуоресценцию в диапазонах от ультрафиолетовой до красной (250—700 нм) частей спектра, а регистрировать соответственно от синей до ближней ИК-области (350—1100 нм).

Ниже рассмотрены основные узлы и функциональная схема импульсного флуорометра пикосекундного временного разрешения, созданного на кафедре биофизики Биологического факультета МГУ.

## Источник возбуждающего света

В качестве источника возбуждающего света используют лазер на фосфатном стекле с неодимом, работающий в режиме самосинхронизации мод. Резонатор задающего генератора с базой 1,5 м образован двумя зеркалами с коэффициентом отражения 50 и 100 %. «Глухое» зеркало (100 %) одновременно является задней стенкой кюветы, модулирующей добротность резонатора. В такой конструкции отсутствуют потери на паразитные отражения, которые неизбежно возникают при помещении в резонатор отдельно собранного модулятора. Через кювету модулятора осуществляется непрерывная прокачка красителя, что позволяет генератору работать в частотном режиме.

В качестве активного элемента использован стержень из фосфатного стекла с концентрацией ионов неодима  $\sim 5\%$ . Торцы стержня срезаны под углом  $85^\circ$ , что исключает образование дополнительных резонаторов между торцами и глухим зеркалом.

Существенным недостатком лазеров с самосинхронизацией мод является плохая воспроизводимость временных и энергетических характеристик излучения от вспышки к вспышке. Чтобы повысить степень синхронизации мод, был осуществлен режим генерации, при котором нелинейные этапы просветления фильтра и насыщения усиления оказываются совмещенными во времени. Этот режим реализовали экспериментально путем подбора оптимальной геометрии резонатора и начального пропускания раствора красителя в модуляторе. Для подавления высших поперечных мод использовали диафрагму диаметром 2 мм и телескоп. Кроме того, температуру активного элемента поддерживали постоянной с точностью  $\pm 0,5^\circ\text{C}$  с помощью термостата.

Сконструированный таким образом генератор с частотой 0,5 Гц производит последовательность из  $\sim 20$  импульсов, следующих друг за другом с интервалом  $\sim 10$  нс, длина волны излучения составляет 1060 нм, энергия отдельного импульса в начале цуга 1—2 мДж, длительность 3—4 пс.

В импульсных флуорометрических измерениях предпочтительнее иметь одиночный импульс света, длину волны которого можно изменять соответственно спектру поглощения исследуемых образцов. Поэтому с помощью электронно-оптического затвора Поккельса из цуга импульсов выделялся один с энергией на выходе затвора 0,5—1 мДж. В качестве затвора использовали промышленный электрооптический модулятор типа МЛ-102. В необходимых случаях выделенный одиночный импульс света усиливали, так что на выходе усилителей его энергия может достигать 50 мДж.

Для изменения частоты основного излучения неодимового лазера используют последовательное умножение (генерация гармоник) частоты в нелинейных кристаллах типа КДР. В итоге описанный здесь источник возбуждающего света для импульсного флуо-

рометра с частотой повторения 0,5 Гц (либо в одиночном режиме) генерирует импульсы света с  $\lambda = 1060, 530, 353, 265$  нм. Длительность отдельного импульса составляет  $\sim 3$  нс. Преобразование частоты в более широком спектральном диапазоне может быть достигнуто с привлечением других нелинейных эффектов.

### Система регистрации флуорометра

Наиболее распространенным прибором, прямо регистрирующим ультракороткие световые импульсы, является *электронно-оптическая камера* (ЭОК). В настоящее время уже реализованы ЭОК с разрешающей способностью  $< 1$  пс. Такие устройства нашли широкое применение в исследовании характеристик пикосекундных лазерных импульсов. Однако с ростом временного разрешения падает чувствительность ЭОК, поэтому ее применение для регистрации коротких и слабых свечений биообъектов сопряжено с преодолением значительных трудностей.

В описываемой установке в качестве регистратора использован промышленный фотохронограф «Агат-СФ». При соответствующем подборе параметров управляющих электрических импульсов эта камера обеспечивает субпикосекундное временное разрешение. Чтобы повысить чувствительность с экраном камеры, последовательно сопряжены одна или две усиливающие микроканальные пластины, а также вакуумный усилитель яркости, фотокатод и анод которого нанесены на волоконные стекла. Такая ЭОК с усилителями имеет несколько худшее временное разрешение ( $\sim 2$  пс), однако вполне может быть использована в качестве регистратора флуоресценции в импульсном пикосекундном флуорометре.

Как отмечалось выше, корректное проведение измерений длительности флуоресценции требует контроля параметров импульса возбуждения в каждом опыте. С этой целью часть энергии одиночного возбуждающего импульса можно подавать непосредственно на фотокатод ЭОК с некоторым фиксированным опережением относительно времени прихода флуоресценции. Этот простой способ позволяет постоянно контролировать аппаратную функцию прибора  $K(t)$  и обеспечивает возможность измерения относительных изменений квантового выхода образца. Для этого площади под кривыми регистрируемого сигнала  $\Phi(t)$  и аппаратной функции, полученными после обработки изображения с выходного экрана ЭОК, калибруют в единицах энергии и их отношение будет пропорционально отношению квантовому выходу флуоресценции образца.

Наиболее распространены два способа регистрации свечения экрана ЭОК: фотографический и фотоэлектрический. Первый способ прост и получил наибольшее распространение. Вместе с тем общеизвестные недостатки, присущие фотографическому способу, явились причиной поиска других, более чувствительных и быстродействующих систем обработки информации, содержащейся в свечении экрана ЭОК.

## Система автоматического считывания и обработки информации

Разработанная и реализованная быстродействующая *система обработки информации*, считываемой с экрана ЭОК, состоит из телевизионного преобразователя свет — сигнал (телекамеры), последовательно сопряженной с видеомонитором, анализатором импульсов, графопостроителем и перфоратором для ввода считываемой информации в ЭВМ.

Наиболее распространенным и простым в эксплуатации преобразователем свет — сигнал является передающая телевизионная трубка с электропроводящей мишенью из фотосопротивления — *видикон*.

Основными характеристиками видиконов являются световая характеристика свет — сигнал, разрешающая способность, отношение сигнал/шум, инерционность, спектральная чувствительность.

*Характеристика свет — сигнал* представляет собой зависимость тока сигнала передающей трубки от освещенности на ее фотокатод. По этой характеристике можно судить о линейности и рабочей освещенности фотослоя. Световые характеристики видиконов существенно зависят от выбора потенциала сигнальной пластины. С увеличением напряжения ток сигнала и линейность увеличиваются, однако одновременно растет и темновой ток, неравномерность которого значительно ухудшает качество изображения. Возможность вычитания фона, выполняемая анализатором, позволяет исключить помехи, вызываемые темновым током видикона.

Под *разрешающей способностью телевизионной системы* понимают количественную оценку возможности различения мелких деталей изображения. Анизотропность телевизионного изображения, связанная со строчной структурой телевизионного растра, приводит к необходимости отдельно рассматривать разрешающую способность по горизонтали (вдоль строк) и по вертикали. Разрешающая способность в обоих направлениях зависит от структуры фотопроводящей мишени и качества фокусировки считывающего электронного луча. Разрешающая способность по вертикали определяется также числом строк в растре, а по горизонтали — зависит от ширины полосы пропускания усилительного тракта видеосигнала.

*Отношение сигнал/шум* — важнейшая характеристика преобразователя свет — сигнал и телевизионной системы в целом. Она определяет чувствительность телевизионной системы, ее разрешающую способность, качество изображения при визуальном восприятии, возможность подключения к телевизионному каналу различных автоматических решающих устройств. В видиконах сигнал снимается с сигнальной пластины и шумы преобразователя оказываются гораздо меньше шумов входного каскада усилителя. Поэтому отношение сигнал/шум телевизионной системы в основном определяется шумами усилителя.

Инерционность видикона характеризует запаздывание изменения сигнала на входе трубки по отношению к изменению интенсивности входного светового сигнала. В наибольшей степени инерционность преобразователя свет — сигнал будет проявляться при передаче движущихся изображений. Относительно высокая инерционность видиконов не является препятствием, так как изображение на выходном экране ЭОК появляется практически мгновенно (0,004—10 нс) и остается неподвижным на время высвечивания люминофора (примерно 100—200 мкс).

Спектральная чувствительность видикона определяется зависимостью значения тока сигнала трубки от спектрального состава передаваемого изображения. Выходной экран используемой ЭОК, а также вакуумного усилителя яркости покрыт люминофором марки К-71 с максимумом кривой спектра излучения  $\lambda = 460$  нм и шириной на полувысоте  $\Delta\lambda = 60$  нм. В этой области спектра могут работать практически все имеющиеся телевизионные трубки.

Основным требованием, предъявляемым к видикону для считывания информации с экрана ЭОК, является обеспечение неискаженного преобразования в электрический сигнал неподвижного, но относительно короткоживущего ( $\sim 0,2$  мс) многомерного свечения. Интенсивность этого свечения экспоненциально снижается во времени.

Коэффициент усиления современных ЭОК достигает значения  $10^6$ , при этом возможна регистрация каждого фотоэлектрона, испущенного фотокатодом. При такой чувствительности фотоэлектроны на экране ЭОК видны в виде световых точек, яркость которых различна, поскольку коэффициент усиления яркости в многокамерной ЭОК является флуктуирующей величиной. Требования к чувствительности и пространственному разрешению видикона вытекают из необходимости регистрации сигнала от каждого фотоэлектрона.

При регистрации телекамерой сигналов выходного экрана ЭОК, работающей в режиме однократной развертки, можно разделить процессы накопления потенциального рельефа на мишени видикона и его считывания. При этом рабочий цикл передающей трубки разбивается на два этапа: регулируемый по длительности процесс накопления и считывание накопленного рельефа по памяти за несколько кадров. Разделение процессов накопления рельефа и считывания приводит к значительному увеличению чувствительности телекамеры.

В описываемой установке была применена телевизионная камера с видиконом типа «суперкремникон» (промышленное изделие ЛИ-702). Телевизионная камера сопрягалась с экраном ЭОК таким образом, что телевизионные строки раstra располагались перпендикулярно направлению развертки изображения входной щели ЭОК во времени, а номер строки соответствовал временной координате.

Сравнение характеристик фотопленки и телевизионных передающих трубок показывает следующее. 1. В видиконе процесс преобразования света в энергию фотоэлектрона намного более эффективен, чем аналогичный процесс преобразования фотонов в зерна серебра на фотопленке. 2. Фотозффект линеен вплоть до самых низких уровней света, а восприимчивость фотомишени не исчезает скачком, подобно восприимчивости фотоэмульсии. 3. Результаты преобразования могут быть получены в виде электрического сигнала, который легко и удобно обрабатывать. 4. Сигнал темнового фона можно вычистить электронным способом, благодаря чему увеличивается контраст полезного сигнала в нужном диапазоне интенсивностей.

Спроецированный на мишень видикона световой сигнал считается электронным растром за 5—10 кадров, т. е. за время, равное 200—400 мс. Этого времени недостаточно для визуальной оценки и обработки получаемой информации, поэтому необходимо применение промежуточного запоминающего устройства. Таким устройством может служить видеоманитофон, ЭВМ или многоканальный анализатор.

В качестве промежуточного запоминающего устройства использован многоканальный анализатор NOKIA LP-4840, в котором предусмотрены операции покадрового суммирования, интегрирования, дифференцирования и вычитания нулевого уровня, а также возможность накопления данных на магнитной ленте или перфоленте, воспроизведения накопленной информации на экране видеомонитора или с помощью графопостроителя.

Видеосигнал (сигнал изображения) является функцией времени, а его мгновенное значение пропорционально яркости передаваемого элемента изображения. Полезная часть сигнала занимает не всю строку и может меняться в зависимости от размера входной щели ЭОК и масштаба передачи изображения щели на мишень видикона. Поэтому для устранения влияния помех на результаты необходимо применение методов временной фильтрации полезного сигнала. Кроме того, видеосигнал имеет широкий частотный спектр ( $\sim 4$  МГц) и складывается из полезного сигнала и шумового. Если его после усиления подать непосредственно на вход аналого-цифрового преобразователя, то величина амплитуды видеосигнала будет считываться лишь в одной точке огибающей полезного сигнала, а остальная часть — теряться. Поэтому перед подачей на АЦП анализатора сигнал видикона подвергают преобразованию.

Наиболее широкое применение в измерительной технике получили *интегрирующие преобразователи* (интеграторы), обладающие высокой способностью подавлять периодические и случайные шумы, а также высокой точностью, простотой схемного решения.

Видеосигнал с телекамеры подается на вход интегратора, который открывается управляющим импульсом от временного селективного устройства — ворот — и пропускает только полезную часть



сигнала. Ворота, в свою очередь, управляются кадровыми и строчными синхроимпульсами. После интегрирования видеосигнал усиливается до напряжения 4 В и подается на вход АЦП анализатора.

Ранее отмечалось, что чем выше временное разрешение ЭОК, тем ниже ее чувствительность, так как плотность фотоэлектронов, попадающих на экран, обратно пропорциональна скорости развертки. Очевидно, при регистрации слабых световых импульсов ультракороткой длительности исследуемый сигнал будет сильно маскироваться фоновым свечением ЭОК, что значительно затрудняет, а порой делает невозможным получение полезной информации. Кроме того, динамический диапазон скоростных ЭОК довольно низок, и это накладывает определенные ограничения на возможность исследования гетерогенного свечения, компоненты которого имеют разные интенсивности.

Наиболее радикальным способом повышения чувствительности и увеличения динамического диапазона пикосекундного импульсного флуорометра с ЭОК в качестве регистратора является обеспечение режима накопления световых сигналов.

Схема описываемого импульсного флуорометра приведена на рис. 43.

Источником возбуждающего света служит лазер на фосфатном стекле с неодимом (генератор), генерирующий последовательность импульсов света пикосекундной длительности ( $\lambda = 1060$  нм). С помощью пластинки (зеркала  $Z_1$ ) часть света (10 %) подается на фотокатод коаксиального фотоэлемента (ФЭ), управляющего работой затвора Поккельса (СВОИ), служащего для выделения одиночного импульса света. Этот же импульс света используется для запуска системы регистрации.

В необходимых случаях выделенный одиночный импульс света усиливается (У-1, У-2). Благодаря последовательному преобразованию в генераторе гармоник (ГГ) диапазон длин волн генерации установлен представлен линиями 1060, 530, 353 и 265 нм, коэффициент преобразования энергии основного излучения (1060 нм) во вторую, третью и четвертую гармоники составляет около 60, 20 и 5 % соответственно.

Излучение соответствующей длины волны выделяется светофильтром (Ф) и используется для возбуждения флуоресценции в образце (О). Свечение флуоресценции собирается с передней грани кюветы светосильной оптикой—коллиматором (К) с относительным отверстием 1:1,5. Для выделения определенной спектральной области служат интерференционные светофильтры (ИФ), помещаемые между образцом и входной щелью ЭОК (Щ). Важно отметить, что в кюветной части предусмотрена возможность охлаждения образца до гелиевых температур. Коллиматор формирует изображение светящейся поверхности образца на входной щели ЭОК.

Важным элементом импульсного флуорометра является отводная пластинка ( $Z_2$ ), с помощью которой часть энергии возбуждающего импульса подается с некоторым опережением относительно времени прихода импульса флуоресценции на фотокатод ЭОК. Именно таким образом в эксперименте осуществляется контроль аппаратурной характеристической функции и энергии возбуждающего импульса.

Проверка линейности, динамического диапазона и временного разрешения установки осуществляется следующим образом. Одиночный импульс света длительностью  $\sim 3$  пс ( $\lambda$  530 нм) пропускает-

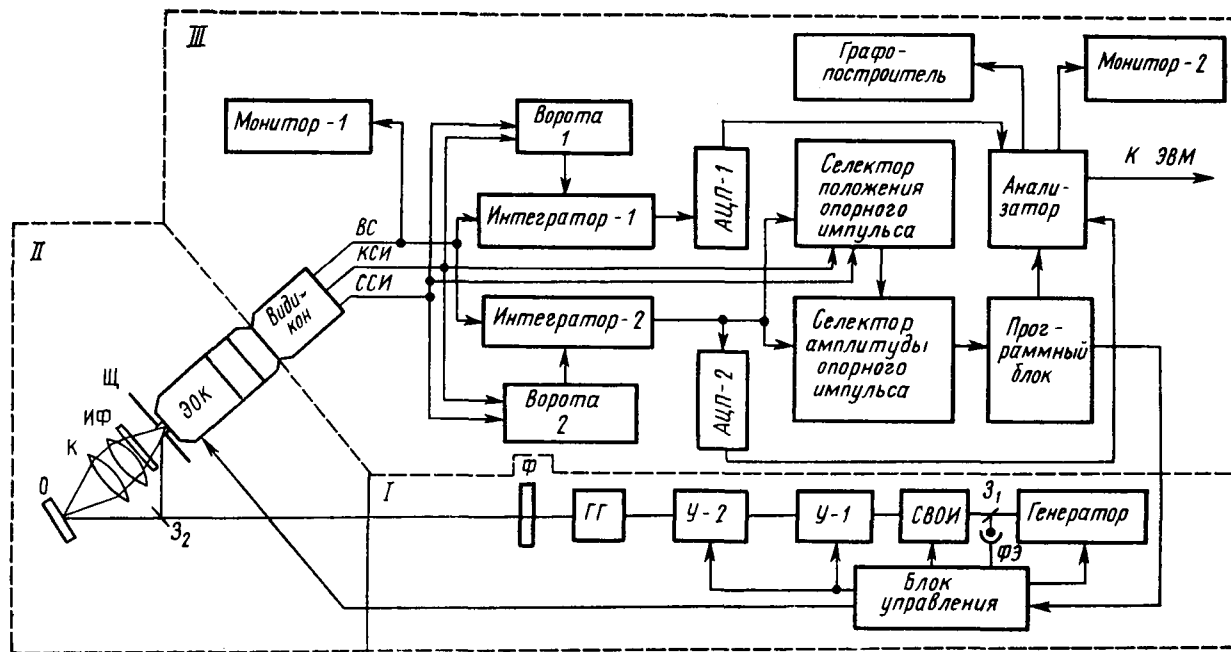


Рис. 43. Схема пикосекундного импульсного флуорометра:

*I* — источник импульсов света пикосекундной длительности, *II* — система регистрации, *III* — система автоматического считывания и обработки информации; ВС — видеосигнал, КСИ — кадровый синхронимпульс, ССИ — строчный синхронимпульс; остальные объяснения см. в тексте

ся через пару полупрозрачных зеркал, отстоящих друг от друга на расстоянии  $d$ . В результате получается последовательность калибровочных импульсов, идущих друг за другом с временным интервалом  $\Delta t = 2d/c$ , где  $c$  — скорость света. Интенсивность последующего импульса  $I_k = T^2(1 - T)^{2k}$ , где  $T$  — коэффициент пропускания зеркал,  $k$  — номер импульса. Отношение  $I_{k+1}/I_k = (1 - T)^2$  является постоянной величиной, а огибающая импульсов будет описываться уравнением

$$I(t) = I_0 \exp \left[ \frac{t}{\Delta t} \ln(1 - T)^2 \right].$$

Калибровочный пуг импульсов подается на входную щель ЭОК и разворачивается во времени. Обработка результатов калибровочных измерений показывает, что временное разрешение флуорометра достигает 3—4 пс, динамический диапазон системы ЭОК — видикон — анализатор на линейном участке характеристики свет — сигнал составляет (для разных камер) 20—100, чувствительность позволяет регистрировать световые потоки на уровне  $10^8$  —  $10^9$  квант/см<sup>2</sup>.

## § 5. Пикосекундный абсорбционный спектрометр

Наиболее важными параметрами, определяющими достоинства абсорбционного спектрометра, являются следующие.

**1. Спектральный диапазон.** Как правило, в абсорбционных спектрометрах источником пикосекундных импульсов света являются твердотельные лазеры, генерирующие дискретный набор длин волн света. В описываемом спектрометре, в частности, в качестве генератора света используют лазер на алюмоиттриевом гранате, длина волны излучения которого составляет 1064 нм и может быть преобразована в излучение гармоник с  $\lambda = 532, 355$  и 266 нм. При исследовании широкого класса соединений необходимы источники возбуждающего и зондирующего излучений существенно большего спектрального диапазона. С этой целью в канале возбуждения используют параметрическое преобразование частоты излучения, позволяющее получить перестройку в диапазоне 400—1600 нм. Так как энергия зондирующих импульсов значительно ниже энергии возбуждающих, перестройку длины волны лазерных импульсов в канале зондирования можно осуществить либо с помощью параметрических генераторов света (ПГС), либо использовать явление генерации пикосекундного континуума, возникающего при фокусировке мощного лазерного импульса в нелинейную среду. Например, при использовании в качестве нелинейной среды  $D_2O$  получают пикосекундные импульсы в диапазоне 500—950 нм.

**Чувствительность.** Под чувствительностью абсорбционного спектрометра понимают те минимальные фотоиндуцированные изменения оптической плотности образца, которые можно уверенно

регистрировать с вероятностью 68%. Чувствительность зависит от многих факторов: свойств лазерных импульсов, фотоприемников, системы считывания и обработки информации.

**Временное разрешение.** Максимальное временное разрешение спектрометра определяется следующими параметрами: длительностью лазерных импульсов, стабильностью их генерации (по энергии и длительности), чувствительностью установки, которая определяет точность построения кинетических кривых, линейностью фотоприемников. Точность совмещения модельных и экспериментальных кривых определяет матобеспечение установки — функциональные возможности ЭВМ и периферийных устройств.

При использовании в качестве источника света лазера на алюмоиттриевом гранате с длительностью импульса  $\sim 30$  пс, с селекцией лазерных импульсов по длительности и энергии при чувствительности  $\sim 3 \cdot 10^{-3}$  единиц оптической плотности, а также использовании ЭВМ «Электроника НЦ-80» с широким набором периферийных модулей реализовано временное разрешение 3 пс в том случае, когда величина максимального изменения оптической плотности превышает  $3 \cdot 10^{-2}$  единиц оптической плотности.

**Линия задержки.** При проведении пикосекундных абсорбционных измерений необходим аккуратный отсчет разности относительных времен между возбуждающим и зондирующим импульсами. Дж. В. Шелтон и Дж. А. Армстронг осуществили задержку зондирующего импульса относительно возбуждающего с помощью прямоугольной стеклянной призмы, закрепленной на подвижном столике. Расчеты показывают, что перемещение столика на 1 мм обеспечивает изменение относительной временной задержки на 6,6 пс. Такая линия задержки получила наибольшее распространение. О других способах получения задержанных друг относительно друга импульсов можно прочесть в рекомендуемой литературе.

В описываемом спектрометре используются две линии задержки, в которых перемещаемым элементом является прямоугольная стеклянная призма. Одна на временной диапазон 0—2 нс перемещается шаговым двигателем, управляемым ЭВМ, и обеспечивает точность относительного отсчета времен  $\pm 2$  пс. Другая линия задержки — на временной диапазон 2—12 нс с погрешностью отсчета перемещения 2 мм.

**Спектральная селекция.** Для спектральной селекции диапазонов зондирования обычно употребляют монохроматоры, снабженные шаговыми двигателями. В описываемом спектрометре в качестве зондирующего света используется пикосекундный континуум, генерируемый с  $D_2O$ . Двойная спектральная селекция импульсов зондирования осуществляется интерференционным клином (регулируемый спектральный диапазон 300—1100 нм), который выделяет спектральный участок полушириной  $\Delta\lambda = 30$  нм. Окончательная селекция проводится с помощью монохроматора МДР-4.

Схема пикосекундного абсорбционного спектрометра приведена на рис. 44. Источником световых импульсов пикосекундной длительности является лазер на алюмоиттриевом гранате, в резонатор которого введены необходимые селективирующие элементы и реализована непрерывная прокачка красителя (пассивного модулятора добротности) через клювету, одна из стенок которой представляет собой 100%-ное зеркало. Используемая конфигурация резонатора, а также системы охлаждения и питания позволяют лазеру работать

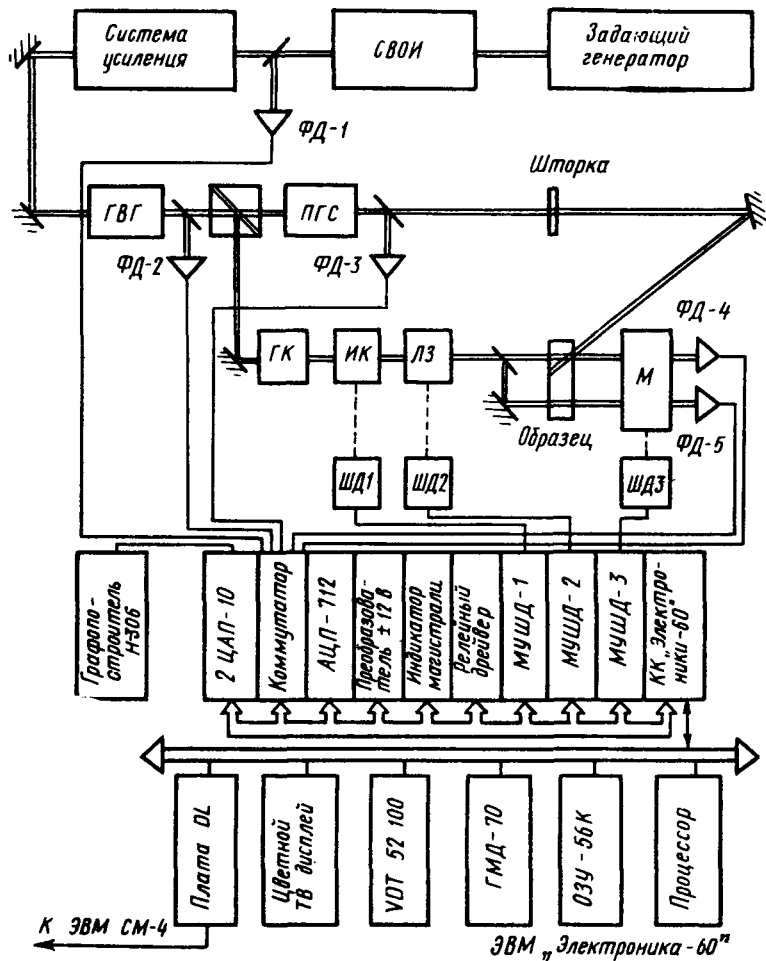


Рис. 44. Схема пикосекундного абсорбционного спектрометра:

СВОИ — система выделения одиночного импульса, ФД — фотодиод, ГВГ — генератор второй гармоники, ГК — генератор континуума, ИК — интерференционный клин, ЛЗ — линия задержки, М — монохроматор

с частотой следования импульсов до 3 Гц при длительности на полувысоте  $\sim 25$  пс. Выходное излучение генератора представляет собой последовательность из 7—9 импульсов света с суммарной энергией  $\sim 10$  мДж. Интервал между импульсами  $\sim 9$  нс.

Выделение одиночного импульса из цуга осуществляется с помощью промышленного электрооптического затвора типа МЛ-102, управляемого относительно низким полуволновым напряжением (380 В для  $\lambda = 1064$  нм). Одиночный лазерный импульс с энергией  $\sim 1$  мДж усиливается в двух усилителях света до энергии  $\sim 20$  мДж. Для улучшения структуры импульса на выходе усилительной системы применяют пространственные фильтры — пары софокусных линз, в фокусе которых помещены диафрагмы.

Перестройка по частоте импульсов возбуждающего и зондирующего света осуществляется с помощью параметрического генератора света и генератора пикосекундного континуума соответственно. Для получения континуума необходимо излучение с  $\lambda = 1064$  нм и энергией  $\geq 5$  мДж, для накачки ПГС — импульсы света второй гармоники с  $\lambda = 532$  нм. В установке удвоение частоты излучения производилось в кристалле KDP ( $l = 1$  см) с энергетическим коэффициентом преобразования  $\sim 50$  %.

Пространственное разделение импульсов основной частоты и второй гармоники осуществляется с помощью призмы Глана — Тейлора, излучение основной частоты фокусируется затем в кювету с  $D_2O$  длиной 10 см. Энергия континуума в области 500—950 нм составляет  $\sim 40$  мкДж. В канале зондирования (рис. 44) помещены также интерференционный клин, линия задержки и монохроматор, управляемые шаговыми двигателями (ШД).

В канале возбуждения используется свертлюминесцентная схема ПГС, обеспечивающая высокую энергетическую эффективность и простоту исполнения. Здесь используются два кристалла KDP ( $l = 40$  мм) с угловой перестройкой длины волны излучения. Такая схема позволяет осуществить изменение длины волны возбуждающего света в диапазоне 800—1600 нм с энергетической эффективностью 5—10 %. С помощью генератора второй гармоники для ПГС нижняя граница спектрального диапазона возбуждающего импульса может быть смещена до 400 нм.

Принцип метода абсорбционной спектроскопии состоит в сравнении интенсивностей импульса, прошедшего через невозмущенную область образца, и пробного импульса, прошедшего через образец в месте облучения возбуждающим светом. Пробный импульс и импульс сравнения имеют диаметр 0,7 мм и возникают из зондирующего с помощью светоделительного зеркала. Возбуждающий импульс имеет диаметр 2 мм. Прошедшие через образец импульсы света подаются затем на входную щель монохроматора МДР-4 и регистрируются двумя фотодиодами, нагруженными на операционный усилитель.

Система регистрации и управления спектрометром собрана на базе ЭВМ «Электроника НЦ-80», сопряженной с набором модулей, выполненных в стандарте КАМАК.

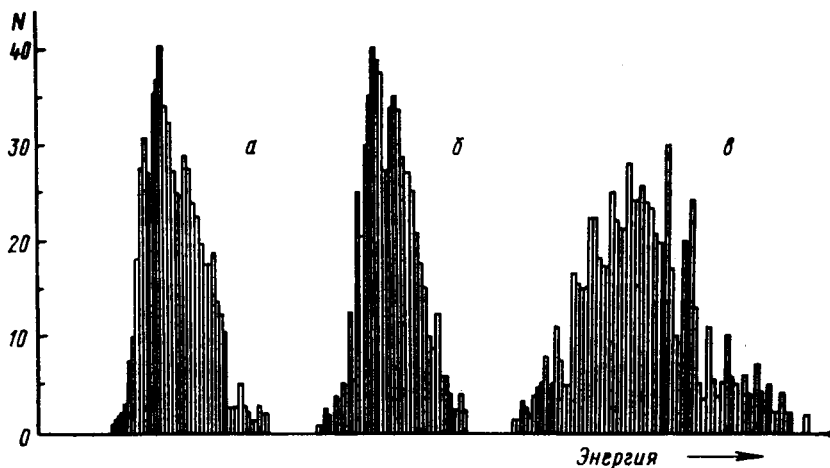


Рис. 45. Статистическое распределение лазерных импульсов по энергии задающего генератора (а), после усиления возбуждающего импульса (б), в отсутствие пространственных фильтров (в)

Система включает в себя набор фотодиодов для контроля работы лазера и сбора информации, штатный комплект ЭВМ с расширенной до 56 Кбайт оперативной памятью, снабженный накопителем на магнитных дисках типа НГМД-6022. Через канал ЭВМ подключены также алфавитно-цифровой дисплей VDT-52100 и графический дисплей на базе телевизионного (ТВ) приемника «Электроника 402». Кроме того, к системе подключен двухкоординатный графопостроитель Н-306. Прием и преобразование информации с фотодатчиков осуществляется модулями «Коммутатор» и АЦП-712, шаговые двигатели управляются модулями МУШД, для обработки большого массива данных обеспечена связь с ЭВМ СМ-4.

Программное обеспечение спектрометра сформировано на модульном принципе.

Программные модули вызываются к действию нажатием определенной кнопки на алфавитно-цифровом дисплее. Используют операционную систему РАФОС, язык программирования ФОРТРАН, программные модули, обслуживающие КАМАК, написаны на Макроассемблере и имеют развитую систему приоритетов, связанную со спецификой конкретного эксперимента.

Математическое обеспечение включает базовый набор программ: цифровой фильтрации экспериментальных данных, предварительной оценки получаемой информации, восстановления сигнала, интегрирования, дифференцирования, анализа кинетики переходных процессов для случая, когда исследуемый процесс представлен суммой экспонент, разложения спектра на сумму гауссовых компонентов.

Как уже отмечалось, из-за нестабильности работы лазерных генераторов света импульсы от вспышки к вспышке отличаются по энергии, временной и пространственной структуре. Для определения области допустимости отклонений длительности и энергии опыта возбуждающего и зондирующего излучений в начале каждого опыта снимаются гистограммы их распределения. Такой отбор уменьшает также вариации в спектре континуума. Кро-

ме того, селекция возбуждающего импульса позволяет избежать нелинейных эффектов в исследуемом образце. Однако и селекция импульсов по энергии не исключает статистической ошибки в определении оптической плотности  $\Delta A$ .

Для исследования статистических характеристик различных параметров пикосекундных импульсов разработана соответствующая программа, обеспечивающая получение гистограмм одновременно от нескольких фотоприемников. При этом на экран графического дисплея выводится гистограмма требуемого фотоприемника с одновременной экспозицией числовых значений средней энергии  $\bar{E}$ , дисперсии  $\sigma$  и коэффициента вариации  $\Delta = \sqrt{\sigma/\bar{E}}$ . В качестве примера на рис. 45 приведены графики статистического распределения 500 импульсов основной частоты лазера после задающего генератора, после усилителей, а также гистограмма импульсов с плохой поперечной структурой пучка, когда флуктуации энергии значительно возросли.

Разработанная методика накопления и обработки статистических данных методом амплитудного анализа позволяет в процессе эксперимента контролировать значения флуктуационных параметров световых импульсов.

## § 6. Абсорбционный спектрометр наномиллисекундного временного диапазона

Принцип работы абсорбционных спектрометров пиконаносекундного и наномиллисекундного диапазонов одинаков, различие заключается в деталях выполнения оптической части и системы регистрации. Поэтому в этом параграфе будет дано лишь описание принципиальной схемы спектрометра для исследования абсорбционных изменений и эмиссионных характеристик образцов в наномиллисекундном диапазоне.

Схема спектрометра приведена на рис. 46. Его оптическая часть включает генератор возбуждающих импульсов (лазер на алюмоиттриевом гранате типа ЛТИ ПЧ-7), генерирующий импульсы света с  $\lambda = 1064, 532, 355$  нм длительностью на уровне  $0,9 \Delta t = 15$  нс; два монохроматора МДР-23 и МДР-3, источник зондирующего излучения (лампа КГМ-300 или инжекционные лазеры) и кюветное отделение. Регистрация оптических сигналов осуществляется либо фотоумножителем, либо фотодиодами. Управление оптической частью спектрометра производится с помощью блоков крейта КАМАК (модули МУЩД для перемещения решеток монохроматоров и «Релейный драйвер», управляющий реле синхронизации).

Общее управление спектрометром — процессом проведения измерений и обработки полученных результатов — осуществляется микроЭВМ «Электроника МС-1201.01», связанной с крейтом КАМАК через контроллер крейта (КК). Программное обеспечение спектрометром условно разделено на две части. Первая управляет изме-



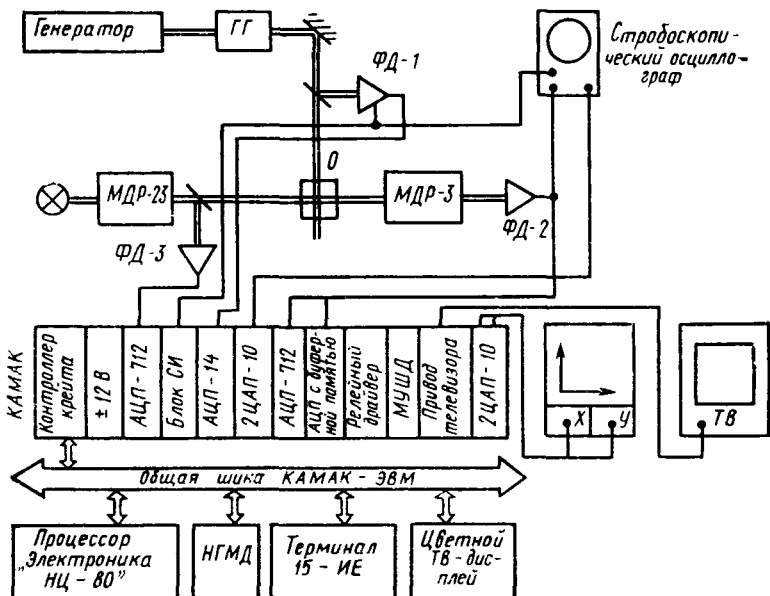


Рис. 46. Схема абсорбционного наномиллисекундного спектрометра: ГГ — генератор гармоник, ТВ — телевизор; остальные объяснения см. в тексте

рительной и оптической частями установки, аналого-цифровыми преобразователями, блоками «Релейный драйвер» и МУШД. Вторая разработана для обработки экспериментальных результатов. В нее входят подпрограммы задания начальных условий, отбора лазерных импульсов по энергии, организации режима накопления и выведения результатов измерений на ТВ-дисплей и двухкоординатный графопостроитель. Кроме того, с помощью этой программы осуществляются цифровая фильтрация данных, предварительная оценка и восстановление сигнала, операции суммирования, вычитания, дифференцирования и интегрирования, разложение переходных кинетик на экспоненты, а спектров — на гауссовы компоненты.

Функционирование спектрометра осуществляется следующим образом. Возбуждающие импульсы от лазера на алюмоиттриевом гранате направляются на образец, индуцируя в нем фотореакции, сопровождающиеся изменениями оптической плотности в различных участках спектра поглощения. Незначительная часть энергии возбуждающего излучения (~10%) отводится на диод синхронизации для контроля и отбора импульсов по энергии, а также синхронизации работы блоков управления и съема информации.

Спектральная область зондирования (в случае использования лампы КГМ-300) выделяется монохроматором МДР-23; постоянный свет необходимого спектрального диапазона слабой интенсивности проходит через образец в месте облучения возбуждающим светом. После образца измеряющий луч падает на фотоприемник, которым регистрируется изменение поглощения.

В диапазоне 830—860 нм в качестве измеряющего источника света могут использоваться инжекционные лазеры, например в случае измерения наведенного поглощения в пигмент-белковых комплексных зеленых растениях ( $T$  —  $T$ -поглощение, контроль состояний  $Xл^+$  или  $Xл^-$ ). Очевидно, описанная система возбуждения образца и регистрации измеряющего света позволяет проводить кинетические измерения и снятие спектров наведенного поглощения.

Сигнал от фотоприемника после усиления подается на вход быстрого АЦП с буферной памятью (8 разрядов, 50 МГц), запускаемого синхрипульсом от фотодиода ФД-1. АЦП преобразует и запоминает измеренный сигнал. Одновременно фотодиод вырабатывает стартовый синхрипульс на АЦП-14 блока КАМАК, с помощью которого измеряется энергия возбуждающего лазерного импульса. Этим же стартовым импульсом запускается программа выборки лазерных импульсов по энергии, и при попадании величины энергии импульса в наперед заданные пределы изменения микроЭВМ включает подпрограмму считывания и запоминания измеренной информации. При накоплении сигналов цикл повторяется до достижения требуемого отношения сигнал/шум, т. е. обеспечения необходимой точности измерения наведенного поглощения.

В установке предусмотрен также непрерывный контроль интенсивности измеряющего света, для чего используются фотодиод ФД-3 и АЦП-712 (10 разрядов, 40 кГц) в крйте КАМАК. Такой контроль необходим при изучении медленных процессов, когда флуктуации энергии измеряющего света могут исказить характер излучаемого явления.

Визуальный контроль осуществляется с помощью осциллографа С1-70, обеспечивающего временное разрешение 25 нс при нагрузке 50 Ом. Описанный спектрограф имеет следующие параметры: длины волн возбуждающего света 532 и 355 нм, спектральная область зондирования 400—900 нм, временной диапазон измерения кинетических процессов 25 нс — 1 с; чувствительность позволяет регистрировать изменение оптической плотности с точностью 0,05 % при 100 накоплениях. Частота генерации импульсов возбуждающего света — от одиночных до 25 Гц, чувствительность при регистрации свечения образцов достигает от 50 до  $10^7$  квант/с в режиме счета фотонов. Это позволяет регистрировать кинетику свечения с временным разрешением 0,3 мкс (таким образом реализуется возможность получения полной кинетики свечения в диапазоне 0,3 мкс — 1 с).

## § 7. Спектрометр комбинационного рассеяния

*Комбинационное рассеяние (КР) света* — хорошо известное физическое явление, широко используемое в исследовании структуры молекулы, ее динамического поведения, внутримолекулярных колебаний и взаимодействия с окружением. Наибольшее применение этот метод нашел в физике и химии, тогда как его использование в биологии сдерживалось главным образом сложностью исследуемых соединений. Лишь в последнее время удалось преодолеть методические трудности, и в настоящее время спектроскопию КР успешно используют в изучении структурно-функциональных свойств фотосинтетического пигментного аппарата, возбудимости нервных волокон, зрительных пигментов, гемоглобина и др.

КР-спектрометр должен удовлетворять следующим требованиям.

1. Возбуждать спектры КР биообъектов несколькими монохроматическими линиями, попадающими в полосы поглощения пиг-

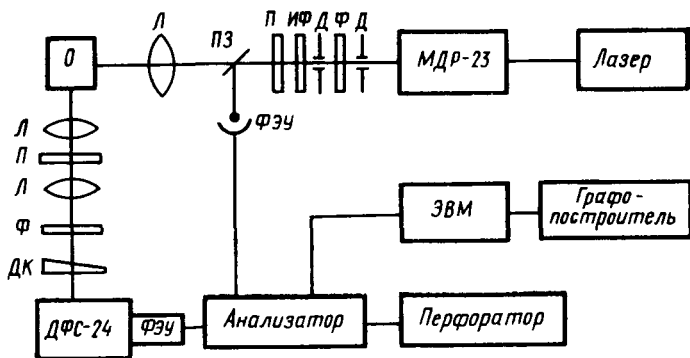


Рис. 47. Схема спектрометра комбинационного рассеяния:

Д — диафрагма, ИФ — интерференционный светофильтр, МДР-23 — монохроматор, О — образец, ПЗ — полупрозрачное зеркало, Ф — светофильтр; остальные объяснения см. в тексте

ментов фотосинтетического аппарата, что позволяет снимать их спектры резонансного КР.

2. Иметь оптимальную оптическую схему возбуждения био-объекта, приготовленного по специальной методике для снятия спектров КР.

3. При снятии спектров КР сильно рассеивающих биологических образцов обеспечить высокий уровень дискриминации рэлеевского рассеяния при малых сдвигах от частоты возбуждения.

4. Автоматически регистрировать, накапливать, запоминать, обрабатывать и воспроизводить спектры КР.

В качестве базового спектрального прибора был выбран отечественный спектрограф ДФС-24, источником возбуждающего света служили серийные отечественные непрерывные газоразрядные лазеры, система регистрации была создана на основе многоканального анализатора импульсов NTA-1024 производства ВНР.

Схема спектрометра приведена на рис. 47.

Источником возбуждающего света служат промышленные непрерывные лазеры, генерирующие излучение с  $\lambda = 441,6; 488; 514,5$  и  $633$  нм. В большинстве случаев интенсивность света, генерируемая лазером, велика, поэтому излучение лазеров ослабляли светофильтрами (Ф) и ирисовыми диафрагмами (ИД). Кроме того, диафрагмы вместе с монохроматором служат для подавления непрерывного фонового излучения газового разряда трубки лазера и постоянного фонового освещения.

Описываемая здесь установка используется для снятия как спектров КР, так и поляризационных спектров люминесценции. В такого рода измерениях необходимо менять поляризацию возбуждающего света. Для этого служат пластинки (П): пластинка  $\lambda/2$  для поворота плоскости поляризации на  $90^\circ$  или пластинка  $\lambda/4$  для правращения линейно поляризованного света в поляризованный по кругу. Отводная пластинка (ОП) и фотодиод (ФД) служат для измерения и контроля стабильности мощности возбуждающего излучения, объектив (Л) образует осветитель образца (О).

Рассеянное образцом излучение собирается системой линз (Л) на входную щель спектрографа ДФС-24. Поляризационную призму (П) (призму Глана) используют как анализатор при поляризационных измерениях. Монохроматор обладает различным пропусканием для света с разной поляризацией, поэтому при снятии спектров КР для исключения влияния этого эффекта перед входной щелью монохроматора устанавливают деполяризующий клин (ДК). Светофильтр служит для устранения света, который может наложиться на исследуемый спектр во втором порядке дифракции.

Регистрация спектров КР в описываемом спектрометре осуществляется фотоэлектронным умножителем ФЭУ-79, работающим в режиме счета фотонов.

Отношение регистрируемого сигнала к шуму тем больше, чем больше время измерения, и пропорционально  $\sqrt{t}$ . Время измерения можно увеличить, уменьшая скорость сканирования и увеличивая постоянную времени усилителя. Однако такой подход связан с возрастанием экспозиции образца, что может привести к его фотодеструкции. Другим подходом к увеличению времени измерения является суммирование спектров КР от нескольких образцов одного и того же вещества. Такую возможность дает многоканальный анализатор импульсов NTA-1024.

При возбуждении окрашенных образцов интенсивность линий резонансного КР зависит от концентрации вещества и геометрии освещения, определяющей потери на перепоглощение. Очевидно, схему освещения необходимо создавать таким образом, чтобы поглощение возбуждающего и рассеянного света было минимальным при оптимальной величине сигнала КР. Следует учитывать также, что при работе с фотоактивными соединениями надо использовать как можно более низкие интенсивности возбуждения, исключающие тепловое и фотохимическое разрушение препарата. В этих условиях выбору оптимальной оптической схемы возбуждения придается большое значение.

Расчеты показывают, что для мощностей рассеянного излучения  $P_1$ ,  $P_2$  в схемах с углом между направлениями возбуждения и регистрации  $90$  и  $180^\circ$  получаются следующие выражения:

$$P_1 = A \frac{P_0}{b} \frac{1 - e^{-\varepsilon(\nu_0)cl}}{\varepsilon(\nu_0)} \frac{1 - e^{-\varepsilon(\nu)cb}}{\varepsilon(\nu)c}; \quad (\text{III.7.1})$$

$$P_2 = \frac{AP_0}{\varepsilon(\nu_0) + \varepsilon(\nu)} (1 - e^{-[\varepsilon(\nu_0) + \varepsilon(\nu)]cb}), \quad (\text{III.7.2})$$

где  $P_0$  — мощность возбуждающего света;  $b$ ,  $c$ ,  $l$  — геометрические размеры рассеивающего объема;  $\varepsilon(\nu_0)$  и  $\varepsilon(\nu)$  — экстинкции в образце на частоте возбуждающего света  $\nu_0$  и регистрации  $\nu$ ;  $A$  — коэффициент пропорциональности, характеризующий тензор КР.

Для слабоокрашенных или прозрачных образцов  $\varepsilon cb \ll 1$ , поэтому формулы (III.7.1) и (III.7.2) существенно упрощаются и для мощностей рассеянного излучения можно получить

$$P_1 = AP_0 cl; \quad P_2 = AP_0 cb.$$

Так как обычно  $l \gg b$ , то  $P_1 \gg P_2$ . Следовательно, при исследовании слабоокрашенных или прозрачных образцов оптимальной является схема освещения под углом  $90^\circ$ .

В другом предельном случае интенсивно окрашенных образцов для мощности рассеянного излучения получаются выражения

$$P_1 = AP_0 / [\varepsilon(\nu_0) \varepsilon(\nu) cb]; \quad P_2 = AP_0 / [\varepsilon(\nu_0) + \varepsilon(\nu)],$$

из которых следует, что  $P_1 \ll P_2$ .

Таким образом, из проведенного анализа видно, что схему с углом  $90^\circ$  между возбуждением и регистрацией целесообразно использовать для снятия нерезонансного КР. Для схемы с углом  $180^\circ$  сигнал КР растет с увеличением концентрации резонансно рассеивающих молекул при малых концентрациях и почти не зависит от нее для значений  $[\varepsilon(\nu_0) + \varepsilon(\nu)] cb > 3$ . Эта схема наиболее оптимальна для снятия спектров резонансного КР. Плотность мощности возбуждающего света, используемая для снятия КР-спектров в схеме с углом  $180^\circ$ , меньше, чем в схеме с углом  $90^\circ$ . Основные параметры лазерного спектрометра КР: 1.  $\lambda$  возбуждающего излучения — 441,6; 488; 514,5; 633 нм. 2. Полуширина аппаратной функции монохроматора на длине волны 500 нм  $\leq 1$  см $^{-1}$ . 3. Обратная линейная дисперсия монохроматора — 0,45 нм/мм. 4. Коэффициент подавления остаточного рассеянного излучения при возбуждении излучением  $\lambda = 441,6$  нм и отстройке 40 см $^{-1}$  от возбуждающей линии и ширине щелей, соответствующих разрешению 4,4; 6, 6 и 8, 8 см $^{-1}$ , составляет соответственно  $10^{7,7}$ ;  $10^7$  и  $10^{6,6}$ . 5. Скорости сканирования спектра — 0,012; 0,04; 0,35 и 1,1 нм/мм. 6. Спектры хлорофилла и его производных (коэффициент экстинкции  $10^5$  л·моль $^{-1}$ ·см $^{-1}$ ) записываются при концентрации пигментов  $10^{-4}$  и выше. 7. Регистрация сигналов КР осуществляется в диапазоне изменения скорости счета фотонов от 60 до  $5 \cdot 10^6$  имп/мин.

Использование автоматизированной системы регистрации спектров КР позволяет существенно упростить их обработку и получить значительно больше информации по сравнению с регистрацией в системе ФЭУ — усилитель — самописец. В качестве демонстрации возможностей разработанной системы регистрации на рис. 48, А приведены спектры одного и того же образца с разным числом накоплений. При числе накоплений  $N = 16$  существенно улучшается отношение сигнал/шум (в  $\sqrt{N} = 4$  раза), что позволяет увеличить интенсивность регистрируемого спектра.

Биологические объекты представляют собой многокомпонентные системы, содержащие большое число люминесцирующих пигментов. Поэтому при многократной записи спектров происходит накопление люминесцентного фона, полностью маскирующего спектр КР. Разработанная система регистрации позволяет осуществить вычитание фона люминесценции и, таким образом, реализовать запись спектров КР люминесцирующих объектов. Из сопоставления

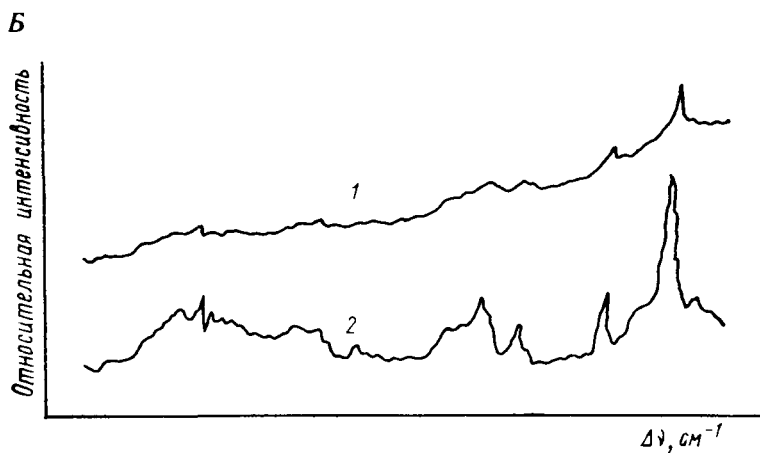
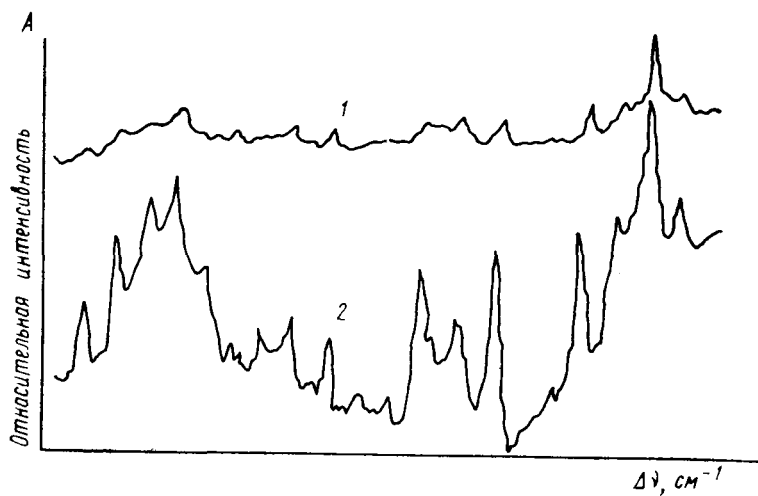


Рис. 48. Спектры комбинационного рассеяния (КР), полученные при различных условиях записи. А — спектр КР одного и того же образца при разном числе накоплений; Б — однократный спектр КР образца без вычитания фона люминесценции (1) и 12-кратный спектр КР без фона люминесценции (2)

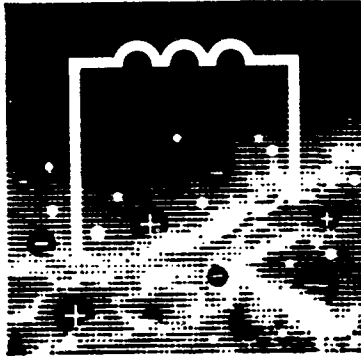
спектров (рис. 4.8. Б) видно, что описанная система регистрации действительно позволяет исследовать спектры КР окрашенных и люминесцирующих образцов.

Использование многоканального анализатора в системе регистрации спектрометра позволяет осуществлять целый ряд операций, облегчающих снятие и интерпретацию спектров. Особенно важно отметить возможность нормирования различных спектров и их сравнения (вычитания) и сочетания анализатора с ЭВМ, что позволяет автоматизировать процедуру обчета спектров.

В свою очередь, ЭВМ снабжена необходимым набором программ для анализа как спектра в целом, так и его отдельных линий. В частности, отдельная широкая полоса может быть разложена на компоненты, что важно для извлечения отдельных линий из уширенной полосы, являющейся суперпозицией вклада элементарных колебаний атомов или групп атомов молекул — компонентов исследуемого соединения.

## Глава IV

### Методы изучения ионной проницаемости биологических мембран



#### § 1. Микроэлектродные методы

Микроэлектроды широко используют при изучении таких мембранных процессов, как возбуждение нервных и мышечных клеток, хемифоторецепция, преобразование световой энергии в хлоропластах, движения в растениях и простейших. Изучение электрических свойств мембран отдельных клеток дает важную информацию о механизмах действия фармакологических агентов и природных физиологически активных веществ, позволяет проследить за изменениями электрических свойств клеток в процессе эмбриогенеза, при росте растений, запуске фотосинтеза.

Одна из основных функций клеточной мембраны состоит в поддержании трансмембранных ионных градиентов и селективного транспорта веществ между цитоплазмой и средой. Ионный баланс поддерживается благодаря наличию в мембране пассивных проводящих путей — селективных ионных каналов, а также систем активного транспорта и обменного транспорта ионов. В специализированных клетках различных видов выявлены системы активного транспорта  $H^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Na^+$ ,  $Cl^-$  и других ионов. Для идентификации активных и пассивных ионных потоков в различных типах клеток необходимо иметь сведения о стационарной величине мембранного потенциала и внутриклеточных концентрациях ионов. Основой для такого анализа служит электродиффузионная теория, согласно которой поток  $J$  независимо движущихся ионов в однородной среде



пропорционален действующей силе — градиенту электрохимического потенциала ( $d\bar{\mu}/dx$ ):

$$J = -cud\bar{\mu}/dx = -uRTdc/dx - zFcutd\varphi/dx, \quad (IV.1.1)$$

где  $\bar{\mu} = \mu_0 + RT \ln c + zF\varphi$ ;  $\mu_0$  — стандартный химический потенциал;  $c$ ,  $u$ ,  $z$  — концентрация, подвижность и валентность иона соответственно;  $\varphi$  — электрический потенциал.

Суммарный поток  $J_i$  представляет собой разность встречно направленных односторонних потоков ( $J_i = \vec{j} - \overleftarrow{j}$ ). Можно показать что односторонние пассивные потоки связаны между собой соотношением Уссинга:

$$\vec{j}/\overleftarrow{j} = c_o/c_i \exp \beta\varphi = \exp [\beta(\varphi_0 - \varphi)], \quad (IV.1.2)$$

где  $\beta = zF/RT$ ;  $\varphi_0$  — равновесный потенциал для данного иона, определяемый по формуле Нернста:

$$\varphi_0 = [RT/(zF)] \ln (c_o/c_i). \quad (IV.1.3)$$

Выполнение соотношения (IV.1.2) при подстановке всех входящих в него величин — односторонних потоков, внутриклеточных концентраций и мембранного потенциала — служит критерием того, что перемещение ионов в обоих направлениях через мембрану происходит пассивно и независимо, без участия специфических переносчиков и активных транспортных систем.

Предварительное заключение о механизмах поддержания неравномерного распределения ионов между клеткой и средой может быть сделано без измерения ионных потоков, на основании сравнения измеряемого мембранного потенциала  $\varphi$  с равновесными потенциалами  $\varphi_0$  для различных ионов. Близость значений  $\varphi$  и  $\varphi_0$  указывает на преимущественно пассивное распределение данного иона между водными фазами мембранной системы, а значительное расхождение значений — на существование в мембране специфических транспортных систем, препятствующих выравниванию электрохимического градиента данного иона.

Можно получить выражение для мембранного потенциала, создаваемого пассивной диффузией:

$$\varphi = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_K [K_o] + P_{Na} [Na_o] + P_{Cl} [Cl_i]}{P_K [K_i] + P_{Na} [Na_i] + P_{Cl} [Cl_o]}. \quad (IV.1.4)$$

Принято считать, что мембранный потенциал нервных и мышечных волокон, а также некоторых других животных клеток обусловлен в основном диффузией ионов K, Na и Cl по концентрационным градиентам.

Однако в некоторых объектах (харовые водоросли, клетки высших растений) мембранный потенциал намного превышает по абсолютной величине значения равновесных потенциалов для любого

из перечисленных ионов, что указывает на существование в мембране дополнительных генераторов потенциала — *электрогенных ионных насосов*. Эти мембранные ферменты транслоцируют заряд через мембрану и способны преобразовывать энергию АТФ или окислительно-восстановительных реакций в электрическую форму.

Нативную клеточную мембрану можно уподобить насосу с утечкой и представить ее в виде эквивалентной электрической схемы, содержащей два параллельных участка с собственными ЭДС и проводимостями.

Микроэлектроды позволяют регистрировать не только стационарные параметры клеточных мембран, но и переходные электрические процессы, вызываемые различными воздействиями. Наиболее подробно изучены явления электрической возбудимости нервных и мышечных волокон.

Мембранные электрические процессы играют ключевую роль в механизме синаптической передачи возбуждения, а также в хемо-, фото- и механорецепции.

Одна из основных проблем биофизики мембран — *проблема биоэнергетики*. Центральная роль в преобразовании энергии света и редокс-процессов в энергию АТФ и другие виды работы в мембранных системах хлоропластов и митохондрий принадлежит трансмембранному электрохимическому градиенту протонов, который включает два компонента: мембранный электрический потенциал и трансмембранный градиент рН.

*Прямые измерения электрического потенциала* на энергосопрегающих мембранах крупных хлоропластов в ряде отношений оказываются предпочтительными по сравнению с оптическими методами регистрации. Эти преимущества связаны с проведением экспериментов на отдельных пластидах, высоким отношением сигнала к шуму и возможностью использовать световые импульсы произвольной длительности.

*Индукционные изменения мембранного потенциала* регулируют перемещение ионов между тилакоидами и стромой хлоропласта, влияя косвенно на активность катионзависимых ферментов цикла Кальвина.

Микроэлектроды используют не только для регистрации мембранных потенциалов, но и в других целях: для электрической стимуляции возбудимых клеток, измерения проводимости мембран, электрофоретической инъекции заряженных веществ. *Методом инъекции* под давлением в клетки вводят не проникающие через мембрану красители, по распространению которых в примыкающие клетки можно судить о наличии межклеточных контактов. Таким же способом в клетки вводят фотобелок *экворин*, используемый в качестве флуоресцентного зонда для регистрации внутриклеточной концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  при различных воздействиях. Пропускание тока через микроэлектрод дает возможность смещать мембранный потенциал и наблюдать за изменениями функциональной активности клетки

или субклеточных структур. Например, приложение внешнего электрического поля изменяет выход флуоресценции хлоропластов, что свидетельствует о модификации переноса электронов в реакционных центрах фотосистемы II. Контролируемое пропускание тока через внутриклеточный электрод в целях смещения мембранного потенциала составляет основу *метода фиксации напряжения* — одного из важнейших методов исследования возбудимых мембран.

Усовершенствование микроэлектродных методов привело в последние годы к созданию *ион-селективных электродов*, позволяющих измерять активность  $K^+$ ,  $H^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Cl^-$  и других ионов в живой клетке. Ион-селективные электроды готовят из обычных микропипеток, заполняя гидрофобизированный кончик пипетки жидким ионообменником или раствором нейтрального переносчика. При измерениях внутриклеточной активности ионов помимо ион-селективного датчика в клетку вводят второй микроэлектрод, который служит электродом сравнения.

Широкое распространение получили микропипетки, сочетающие в себе *микроэлектрод с микроприсоской*. Такие электроды не вводят внутрь клетки, а подводят вплотную к клеточной мембране и слегка втягивают мембрану в присоску. С помощью таких электродов регистрируют токи одиночных ионных каналов в нативной мембране. Микроэлектроды, совмещенные с микроприсоской, обеспечивают высококачественную электрическую изоляцию в области контакта мембраны со стеклом, благодаря чему они оказались удобным инструментом и при регистрации мембранных потенциалов в клетках малых размеров (диаметром до 10 мкм). Для проведения таких измерений после подсасывания клетки к микропипетке мембрану прорывают импульсом давления или электрическим током, в результате чего устанавливается контакт с внутриклеточным содержимым. При этом клетка не получает значительных повреждений. В последующем изложении перечисленные методы начиная с микроэлектродной регистрации биопотенциалов рассмотрены более подробно.

Микроэлектродные методы дают возможность регистрировать изменения мембранного потенциала с временным разрешением 10—100 мкс в функционирующей клетке, не нанося ей существенного повреждения. В отличие от прямых электрических измерений регистрация мембранных потенциалов с использованием потенциалчувствительных красителей зачастую оказывается более инерционной и сопряжена с побочным токсическим действием красителей. Попытки измерять мембранный потенциал растительных клеток по распределению проникающих ионов (типа тетрафенилфосфония) осложнены связыванием этих ионов с мембраной, что приводит к ошибочным значениям (расхождение с реально измеряемыми значениями достигает нескольких десятков милливольт).

Для микроэлектродных измерений пригодны клетки диаметром не менее 10 мкм. Хотя таким способом удавалось измерять мембран-

ный потенциал эритроцитов человека, в ходе измерений наблюдалось быстрое разрушение клеток. При работе с мелкими клетками сказывается и утечка электролита из кончика микроэлектрода, приводящая к изменению ионного состава цитоплазмы.

При измерении мембранного потенциала в клетку вводят микроэлектрод, который устанавливает контакт между внутриклеточной средой и неполяризуемым хлорсеребряным или каломельным электродом сравнения. Второй идентичный электрод сравнения помещают в наружный раствор. Разность потенциалов между электродами измеряют электрометрическим усилителем. В рассматриваемой электрической цепи скачки потенциала на двух электродах сравнения взаимно компенсируются; диффузионный потенциал на кончике микропипетки сравнительно мал, так как подвижность диффундирующих из кончика  $K^+$  и  $Cl^-$  в водных растворах одинакова. Поэтому измеряемая разность потенциалов обусловлена практически полностью скачком потенциала на клеточной мембране. Внутреннее сопротивление вольтметра должно намного (более чем в 100 раз) превышать сопротивление внешней цепи. Несмотря на заполнение микроэлектродов концентрированным раствором  $KCl$ , их сопротивление остается достаточно высоким и составляет 10—100 МОм. Для измерения потенциала в такой цепи необходим электродметр с входным сопротивлением не ниже 10 ГОм.

## § 2. Свойства микроэлектродов

*Микроэлектродами* принято называть капилляры из химически стойкого стекла с оттянутым тонким кончиком, заполненные раствором электролита, хотя в действительности настоящий электрод образуется при контакте металла с электролитом. Микроэлектрод — это только солевой микромостик, позволяющий установить электрический контакт с внутриклеточной средой. Диаметр кончика стандартных микроэлектродов лежит за пределами разрешающей способности светового микроскопа, т. е. составляет менее 0,5 мкм. Минимальные размеры кончика, судя по электронным микрофотографиям, не превышают 0,05 мкм.

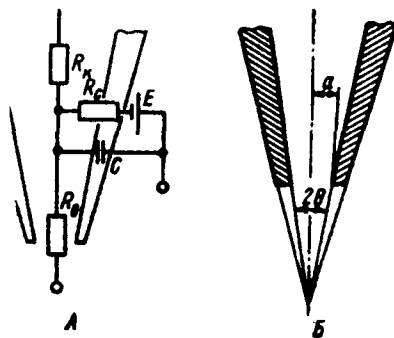
**Потенциал кончика.** Для заполнения микроэлектродов обычно используют концентрированный раствор  $KCl$ . Благодаря одинаковой подвижности  $K^+$  и  $Cl^-$  в воде ( $u_+ = u_-$ ) диффузионный потенциал, определяемый формулой

$$\varphi = \frac{u_- - u_+}{u_- + u_+} \frac{RT}{F} \ln \frac{c_1}{c_2},$$

примерно равен нулю. Однако полностью избежать появления скачка потенциала между микроэлектродом и средой не удастся. Величина потенциала кончика зависит от физических свойств стекла и возрастает с уменьшением толщины кончика. При обламывании микропипетки потенциал кончика исчезает. Возникновение потенциала

Рис. 49. Схема кончика микроэлектрода. *A* — упрощенная эквивалентная электрическая схема; *B* — геометрия кончика микропипетки:

$R_0$  — сопротивление отверстия микропипетки,  $R_c$  — сопротивление стенок капилляра,  $R_k$  — сопротивление электролита в канале микропипетки,  $E$  — разность скачков потенциала на наружной и внутренней поверхностях стекла,  $C$  — емкость кончика; остальные объяснения см. в тексте



кончика связано с ионообменными свойствами стекла и низким сопротивлением стенок капилляра в оттянутом носике микропипетки.

На рис. 49, *A* показано, что электрическая цепь между средой и пипеткой замыкается не только через отверстие микропипетки, но частично и в обход его через тонкие стенки в области кончика. Показанная на схеме ЭДС отражает разность скачков потенциала на границах стекла с раствором. При погружении микроэлектрода в разбавленные солевые растворы потенциал кончика имеет отрицательную величину, точно так же как приобретает отрицательный потенциал стеклянный калевый электрод в среде с низкой концентрацией  $K^+$ . Влияние ЭДС, включенной параллельно основному пути тока, становится тем заметнее, чем меньше сопротивление стенок капилляра.

Появлению потенциала кончика также способствуют электроотрицательные атомы кислорода, входящие в структуру стекла. Внутри капилляра вблизи отрицательно заряженной поверхности создается избыток подвижных катионов, но понижена концентрация анионов. Основными носителями заряда в области двойного слоя становятся катионы, в результате чего на кончике микроэлектрода возникает диффузионная разность потенциалов со знаком «—» внутри кончика.

Потенциалу кончика свойственна зависимость от ионного состава среды. Для того чтобы избежать ошибок в определении потенциала покоя, микроэлектроды сортируют и отбирают только те, у которых потенциал кончика не превышает 5 мВ.

**Диффузия электролита.** При работе с мелкими клетками следует учитывать возможную диффузию электролита из кончика микроэлектрода в цитоплазму. Если радиус отверстия микропипетки равен  $a$ , а угол схождения кончика в радианах —  $2\theta$  (рис. 49, *B*), то скорость диффузии  $KCl$  из микроэлектрода в изотонический раствор электролита рассчитывают по формуле

$$a = -D \text{ ладс,}$$

где  $D$  — коэффициент диффузии,  $c$  — концентрация заполняющего электролита. Расчетная скорость диффузии KCl из микроэлектродов с диаметром кончика 0,2 мкм составляет  $5 \cdot 10^{-14}$  моль/с. Такая утечка KCl не должна влиять на ионный состав сравнительно крупных клеток, но может приводить к набуханию таких мелких клеток, как эритроциты. Экспериментально измеряемая скорость диффузии KCl из кончика микроэлектродов варьирует от  $10^{-15}$  до  $10^{-14}$  моль/с. Диффузия KCl из микроэлектрода не всегда приводит к набуханию даже мелких клеток, объемом порядка 1 пл. Клетки некоторых эпителиальных тканей обладают высокой  $K^+$ -проницаемостью, в результате чего устанавливается стационарный поток  $K^+$  в клетку и из нее в окружающий объем.

**Сопrotивление микроэлектродов.** Микроэлектроды с диаметром кончика 0,2 мкм, заполненные 3 М раствором KCl, обладают сопротивлением от 25 до 50 МОм. Микроэлектроды со слишком высоким сопротивлением имеют большой и нестабильный собственный потенциал, плохо пропускают токи, ухудшают временное разрешение системы.

Сопrotивление микроэлектрода  $R$  зависит от геометрии кончика:

$$R = (\pi\theta\sigma a)^{-1}, \quad (\text{IV.2.1})$$

где  $\sigma$  — проводимость заполняющего электролита (26 См/м для 3 М раствора KCl). Проводимость идеальных растворов определяют из уравнения Нернста — Эйнштейна:

$$\sigma = 2z^2 F^2 Dc (RT)^{-1}.$$

В уравнении (IV.2.1) не учитывают, что проводимость раствора в кончике микропипетки неоднородна по длине вследствие диффузии. Градиент концентрации электролита проявляется в том, что сопротивление микроэлектрода зависит не только от проводимости заполняющего раствора, но и от концентрации солей во внешней среде. Например, 10-кратное снижение наружной концентрации электролита приводит к увеличению сопротивления примерно в пять раз.

**Вольт-амперные характеристики.** Пропускание через микроэлектрод тока более 3 — 5 нА часто приводит к изменению его сопротивления. Это проявляется в нелинейной зависимости тока через микроэлектрод от приложенной разности потенциалов. Форма вольт-амперной характеристики зависит от диаметра кончика. Микроэлектроды с низким сопротивлением и относительно широким кончиком сохраняют квазилинейные электрические характеристики при пропускании тока до десятков наноампер, тогда как для высокоомных электродов нелинейность проявляется при гораздо меньших токах. При подаче на микроэлектрод напряжений в несколько десятков вольт часто можно наблюдать хаотичные колебания тока, объясняемые закипанием электролита в кончике вследствие очень высокой плотности тока. Предельные значения тока, пропускаемого через микроэлектрод, составляют около 1 мкА.

Экспериментально выявлены *два типа нелинейности* вольт-амперных характеристик. В первом случае сопротивление электрода для выходящего тока больше, чем для входящего, и существует предельное значение выходящего тока, которое невозможно превысить. Это явление объясняют повышенной концентрацией катионов в кончике (в области двойного слоя) и вытеснением анионов в направлении к стволу. При выходящем токе катионы перемещаются из электрода в среду, а анионы — в противоположном направлении. При этом в кончике электрода образуется зона с обедненным содержанием носителей заряда и сопротивление возрастает.

Для нелинейности второго типа характерна обратная зависимость: выходящий ток вызывает уменьшение сопротивления. Причиной служит электроосмотический объемный поток раствора, совпадающий по направлению с движением катионов. Движение жидкости приводит к тому, что локальная концентрация электролита в торце пипетки приближается к концентрации заполняющего микроэлектрод раствора (для выходящего потока) или к концентрации наружного раствора (для входящего потока). Так как проводимость среды обычно намного меньше проводимости заполняющего раствора, выходящий ток приводит к снижению сопротивления микроэлектрода. Распределение ионов в торце микропипетки и сопротивление микроэлектрода зависят от длительности пропускания тока через электрод.

**Шумы микроэлектродов.** Спонтанные флуктуации тока и напряжения в области кончика микроэлектрода отражают микроскопическое движение ионов через узкое отверстие пипетки. При равновесии, когда через микроэлектрод не проходит ток, а концентрация электролита в микроэлектроде и среде одинаковы, спектральная плотность теплового шума тока  $S_I$  и напряжения  $S_V$  описывается формулами Найквиста

$$S_I = 4kT/\operatorname{Re} Z; \quad S_V = 4kT \operatorname{Re} Z,$$

где  $k$  — постоянная Больцмана, а  $\operatorname{Re} Z$  — действительная часть импеданса. Для резисторов  $\operatorname{Re} Z = R$  и тепловой шум одинаков в широком диапазоне частот. Тепловой шум резисторов величиной 10 и 100 МОм составляет  $\sim 10^{-27}$  и  $10^{-28}$   $\text{A}^2/\text{Гц}$  соответственно.

При пропускании тока через микроэлектрод, а также при диффузии электролита из кончика возникает дополнительный неравновесный шум. Спектральное распределение шума напряжения в микроэлектродах описывается зависимостью

$$S_V = 4kTR + A(I)H(f),$$

где два слагаемых отражают вклад равновесного и избыточного неравновесного шума. Значение  $R$  равно сопротивлению микроэлектрода для случая, когда наружный и заполняющий растворы идентичны. Сомножитель  $A(I)$  соответствует интенсивности избыточного шума, а  $H(f)$  — его спектральному распределению. Интен-

сивность шумов возрастает пропорционально квадрату силы тока, а спектральное распределение имеет вид  $1/f$ . Мощность шумов  $S_V$  в микроэлектродах варьирует от  $7 \cdot 10^{-11}$  до  $1,5 \cdot 10^{-8}$  В<sup>2</sup>/Гц, что лишь немногим меньше шумов отдельных клеток. Например, флуктуации напряжения в колбочках фоторецепторов черепахи составляют  $(1 \div 5) \cdot 10^{-9}$  В<sup>2</sup>/Гц.

**Емкость микроэлектродов.** При микроэлектродном отведении существует три компонента емкости, шунтирующей входную цепь: входная емкость предусилителя, паразитная емкость ствола микроэлектрода и соединительного кабеля, а также распределенная емкость той части микроэлектрода, которая погружена в омывающий раствор или ткань. Общая емкость является важным параметром, так как вместе с сопротивлением микроэлектрода она формирует фильтр низкой частоты во входной цепи. Погружение кончика микроэлектрода в раствор на каждый миллиметр приводит к возрастанию емкости микроэлектрода на 0,4—1,0 пФ.

### § 3. Усилители биопотенциалов

Для измерения мембранного потенциала с точностью 0,1 % необходим электрометр, входное сопротивление которого в 1000 раз превышает сумму сопротивлений клетки и микроэлектрода. Входные каскады современных усилителей биопотенциалов выполняются на основе операционных усилителей с полевыми транзисторами на входе. Сопротивление таких усилителей составляет  $10^{11}$  Ом и выше.

**Операционный усилитель.** Усилители с дифференциальным входом, высоким входным сопротивлением и высоким коэффициентом усиления ( $K_0 \geq 10^5$ ) называют *операционными*. Выходное напряжение такого усилителя изменяется при появлении разности напряжений между двумя его входами в соответствии с уравнением

$$dU_{\text{вых}}/dt = \omega (U_+ - U_-),$$

где  $U_+$  и  $U_-$  — напряжения на неинвертирующем и инвертирующем входах,  $\omega$  — полоса пропускания усилителя при единичном коэффициенте усиления. Для типичных усилителей на интегральных микросхемах  $\omega$  составляет порядка  $10^7$  с<sup>-1</sup>. Это означает например, что разность напряжений между входами в 1 мВ вызывает сдвиг выходного напряжения со скоростью  $10^4$  В/с. При разности потенциалов на входах 1 мВ и  $K_0 = 10^5$  напряжение  $U_{\text{вых}}$  должно составлять 100 В, что на порядок превышает выходные напряжения обычных операционных усилителей. Данный пример иллюстрирует правило, состоящее в том, что в работающем операционном усилителе разность потенциалов между двумя входами пренебрежимо мала. Иначе говоря, оба входа находятся при одинаковом потенциале.



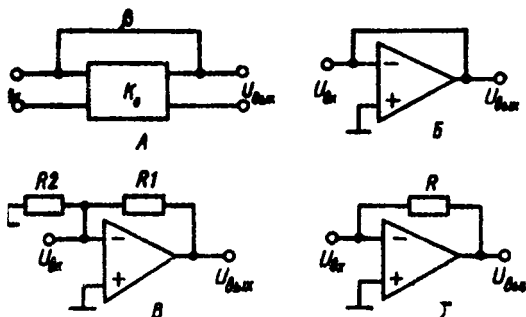


Рис. 50. Усилители с обратной связью. А — общая схема; Б — повторитель напряжения; В — усилитель по напряжению; Г — преобразователь тока в напряжение:

$K_0$  — коэффициент усиления с разомкнутой цепью обратной связи,  $U_{вх}$  и  $U_{вых}$  — входное и выходное напряжение,  $\beta$  — коэффициент обратной связи,  $R$ ,  $R_1$ ,  $R_2$  — резисторы

Произведение коэффициента усиления на полосу пропускания усилителя есть величина, постоянная для каждого усилителя. Поэтому параметр  $\omega$  можно рассматривать как произведение коэффициента усиления на полосу пропускания усилителя, выраженную в рад/с. Связь с частотой в герцах дается соотношением  $\omega = 2\pi f$ . Полоса пропускания при единичном коэффициенте усиления представляет важную характеристику, которая обычно дается в описании прибора.

На практике операционные усилители используют с подключением цепи обратной связи. В зависимости от способа подключения операционный усилитель может быть использован как повторитель, усилитель с переменным коэффициентом усиления, преобразователь ток — напряжение, интегратор, дифференциатор и др. В усилителе с цепью обратной связи часть выходного напряжения подается вновь на вход с полярностью, совпадающей или противоположной входному сигналу (рис. 50, А). В усилителе с отрицательной обратной связью напряжение, подаваемое с выхода на вход, вычитается из внешнего приложенного напряжения:

$$U_{\text{вых}} = K_0 (U_{\text{вх}} - \beta U_{\text{вых}}),$$

где  $K_0$  — коэффициент усиления без цепи обратной связи,  $\beta$  — коэффициент обратной связи, варьирующий в пределах от 0 до 1 ( $\beta = 0$  при размыкании цепи обратной связи,  $\beta = 1$ , если все напряжение выхода поступает на вход). Коэффициент усиления в системе с обратной связью равен

$$K = U_{\text{вых}}/U_{\text{вх}} = K_0/(1 + \beta K_0).$$

Схеме подключения, показанной на рис. 50, Б, соответствует 100%-ная отрицательная обратная связь ( $\beta = 1$ ). Выходное напряжение полностью поступает на инвертирующий вход. Коэффициент

усиления в этом случае равен единице, а полоса пропускания максимальна. При таком подключении усилитель работает в качестве повторителя, достоинствами которого являются широкая полоса пропускания, высокое входное сопротивление, большая стабильность коэффициента усиления и возможность подключения к нему регистрирующих приборов с низким внутренним сопротивлением. Повторитель напряжения составляет первый каскад во всех усилителях биопотенциалов. Сигнал с выхода повторителя обычно подается на дополнительное усиление.

Схема подключения, показанная на рис. 50, В, позволяет получить усилитель напряжения с переменным коэффициентом усиления. Резисторы  $R_1$  и  $R_2$  образуют делитель, причем на вход подается доля  $U_{\text{вх}}$ , пропорциональная  $R_2/(R_1 + R_2)$ . Таким образом,

$$K = K_0 \left[ 1 + \left( \frac{R_2}{R_1 + R_2} K_0 \right) \right]^{-1}$$

при условии, что  $R_2 \ll R_1$ ,  $K \approx R_1/R_2$ .

Для измерения слабых токов широко используют схему преобразователя ток — напряжение (рис. 50, Г). Поскольку входное сопротивление усилителя велико ( $\geq 10$  ГОм), электрический ток через усилитель не проходит, а течет через сопротивление  $R$ . Поэтому справедливы соотношения  $U_{\text{вх}} = iR + U_{\text{вых}}$ ;  $U_{\text{вых}} = -K_0 U_{\text{вх}}$ . При  $K_0 \geq 10^5$   $U_{\text{вх}} = iR/(1 + K_0) \approx 0$ ;  $U_{\text{вых}} = -iR$ , т. е. напряжение на выходе усилителя пропорционально току в измерительной цепи. Коэффициент передачи численно равен  $R$  и имеет размерность В/А.

**Временное разрешение.** Быстродействие усилителя, т. е. способность отслеживать без искажения изменения сигнала на входе характеризуют *полосой пропускания* (рис. 51, А). Для регистрации мембранных потенциалов используют усилители постоянного тока с полосой пропускания от 0 Гц. Верхняя граница полосы пропускания определяется частотой среза  $[f_c; f_c = \omega/(2\pi)]$ , при которой мощность сигнала на выходе усилителя уменьшается вдвое по сравнению с максимальной выходной мощностью. Так как мощность сигнала пропорциональна квадрату напряжения, частоту  $f_c$  находят из соотношения  $V^2/V_{\text{max}}^2 = 0,5$  или  $V = V_{\text{max}}/\sqrt{2} \approx 0,7 V_{\text{max}}$ , где  $V$  — амплитуда синусоидального выходного сигнала на частоте  $f_c$ .

Быстродействие усилителя характеризуют также постоянной времени ( $\tau$ ), которая связана с  $f_c$  соотношением  $\tau = (2\pi f_c)^{-1}$  и отражает скорость экспоненциального нарастания сигнала на выходе усилителя при подаче на его вход прямоугольной ступени напряжения (рис. 51, Б). За время  $\tau$  выходное напряжение успевает измениться примерно на 63 % от общей величины выходного сигнала. Постоянная времени  $\tau$  соответствует такому потенциалу  $V(\tau)$ , для которого выполняется соотношение  $(V_{\text{max}} - V(\tau))/V_{\text{max}} = 1/e$ . Отсюда видно, что  $V(\tau)/V_{\text{max}} = 1 - 1/e \approx 0,63$ .

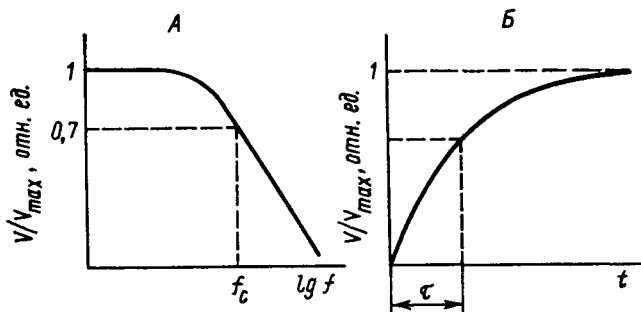


Рис. 51. Динамические характеристики усилителя. А — частотная характеристика; Б — кинетика изменений выходного напряжения при подаче на вход ступенчатого импульса:

$f$  — частота,  $f_c$  — частота среза,  $t$  — время,  $\tau$  — характерное время экспоненты,  $V/V_{max}$  — выходное напряжение усилителя

Длительность фронта выходного сигнала, вызванного подачей на вход ступени напряжения, характеризуют *временем нарастания*  $t_n$ , за которое сигнал на выходе нарастает от 0,1 до 0,9 конечной величины. Частота среза и время нарастания связаны приближенным соотношением  $t_n f_c = 0,35$ , где  $t_n$  выражено в миллисекундах, а  $f_c$  — в килогерцах.

Полоса пропускания промышленных операционных усилителей составляет 0,5 — 15 МГц; соответственно время нарастания должно быть меньше 1 мкс. Однако такие времена нарастания достигаются лишь при прямом подключении усилителя к источнику сигнала с низким импедансом. Реальное быстродействие для случая, когда между источником напряжения и усилителем имеется высокоомное сопротивление, имитирующее микроэлектрод, значительно хуже (например, 5—15 мкс при сопротивлении источника 10 МОм). При подключении усилителя к микроэлектроду временное разрешение дополнительно ухудшается в связи с влиянием входной паразитной емкости.

На рис. 52, А представлена эквивалентная схема входной цепи микроэлектродного усилителя. Конденсатор  $C_{вх}$  обозначает общую входную емкость, создаваемую емкостью микроэлектрода, емкостью между центральной жилой отводящего кабеля и его оплеткой, а также входной емкостью усилителя. Сопротивление микроэлектрода  $R_{мэ}$  и паразитная емкость  $C_{вх}$  образуют фильтр низких частот, в результате чего при подключении ступенчатого напряжения  $E$  форма импульса на входе усилителя будет отличаться от прямоугольной.

Пренебрегая током, текущим через усилитель (т. е. через  $R_{вх}$ ), можно приравнять токи, текущие через  $R_{мэ}$  и емкость  $C_{вх}$ :  $C_{вх} dV/dt = (E - V)/R$ . Отсюда  $V = E \{1 - \exp[-t/(RC)]\}$ .

Потенциал на входе усилителя меняется экспоненциально до максимального уровня  $E$  с постоянной времени  $\tau$ , где  $\tau = R_{\text{мэ}} C_{\text{вх}}$ . При сопротивлении микроэлектрода 100 МОм и суммарной входной емкости 5 пФ постоянная  $\tau$  равна 0,5 мс. Для регистрации многих быстрых процессов такое временное разрешение оказывается недостаточным.

Постоянную времени входной цепи удобно определять, пропуская прямоугольные импульсы тока через микроэлектрод и большое нагрузочное сопротивление ( $R_{\text{н}}$ ;  $R_{\text{н}} \gg R_{\text{мэ}}$ ), как показано на рис. 52, Б. Ток, протекающий через  $R_{\text{н}}$ , равен сумме токов через входную емкость и сопротивление  $R_{\text{мэ}}$ . Из условия баланса токов

$$E/R_{\text{н}} = C_{\text{вх}} dV/dt + V/R_{\text{мэ}}$$

можно найти, что напряжение на входе усилителя ( $V$ ) возрастает экспоненциально с постоянной времени  $\tau = R_{\text{мэ}} C_{\text{вх}}$  начиная с момента включения ступени напряжения  $E$  на выходе генератора.

**Компенсация емкости.** Сопротивление микроэлектрода и суммарная паразитная емкость входной цепи образуют фильтр низких частот, в результате чего ухудшается временное разрешение измерительной системы. Некоторое увеличение быстродействия может быть достигнуто за счет отбора микроэлектродов с наиболее низким сопротивлением и максимального сокращения длины соединительных проводов между микроэлектродом и усилителем. Не следует погружать микроэлектрод глубоко в раствор. Ошибка измерений, связанная с протеканием тока через микроэлектрод и паразитную емкость, может быть дополнительно уменьшена путем пропуска через микроэлектрод тока, равного по значению току ошибки, но имеющего обратное направление. Для этого используют прием компенсации  $C_{\text{вх}}$ .

В схеме с компенсацией емкости (рис. 53, А) добавлены два дополнительных элемента: усилитель с переменным коэффициентом усиления  $K$  и конденсатор обратной связи  $C_{\text{ос}}$ . Для простоты можно считать, что коэффициент усиления основного усилителя равен еди-

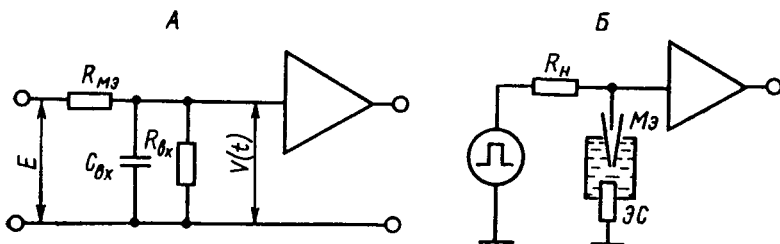
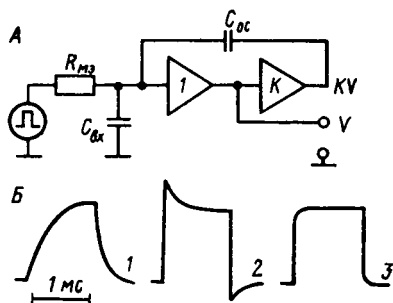


Рис. 52. К анализу временного разрешения усилителя. А — эквивалентная схема входной цепи микроэлектродного усилителя; Б — способ определения постоянной времени измерительной системы:

МЭ — микроэлектрод, ЭС — электрод сравнения; остальные объяснения см. в тексте

Рис. 53. Метод компенсации входной емкости. *А* — принципиальная схема цепи компенсации; *Б* — искажение прямоугольного сигнала в предусилителе при отключенной цепи компенсации емкости (1), при перекомпенсации (2) и неискаженная форма сигнала при оптимальной компенсации емкости (3) (объяснение см. в тексте)



нице. Напряжение на входе первого усилителя обозначается  $V$ ; тогда напряжение на выходе второго усилителя равно  $KV$ , а разность потенциалов на обкладках конденсатора  $C_{ос}$  равна  $KV - V = V(K - 1)$ . Ток через  $C_{ос}$  будет равен  $C_{ос} (dV/dt) (K - 1)$ . Условие коррекции состоит в том, что ток, текущий через паразитную емкость  $C_{вх}$ , должен быть равен току в цепи обратной связи:

$$C_{вх} dV/dt \approx C_{ос} dV/dt (K - 1).$$

Усиление дополнительного усилителя необходимо подобрать так, чтобы выполнялось равенство  $C_{вх} = C_{ос} (K - 1)$ . Как правило, величину  $K$  меняют в пределах от 1 до 5, а  $C_{ос}$  имеет постоянное значение 2—5 пФ. Произведение  $C_{ос} (K - 1)$ , называемое иногда *отрицательной емкостью*, варьирует в пределах от 8 до 20 пФ.

Влияние отрицательной емкости на форму измеряемого прямоугольного сигнала показано на рис. 53, *Б*. Время нарастания  $t'_н$  в режиме полной компенсации входной емкости равно примерно  $2V/\overline{t_0 t'_н}$ , где  $t_0$  и  $t'_н$  — времена нарастания, отражающие быстродействие усилителя и свойства входной цепи в отсутствие компенсации. Например, при введении положительной обратной связи в усилитель с  $t_0 = 1$  мкс время нарастания сигнала во входной цепи должно снижаться от  $t'_н = 200$  мкс до  $t'_н \approx 30$  мкс. При повышении быстродействия усилителя в 10 раз (10-кратное уменьшение  $t_0$ ) время нарастания сигнала во входной цепи уменьшается примерно втрое.

Расширение полосы пропускания усилителя путем компенсации емкости приводит к возрастанию уровня шумов, что особенно заметно при измерении слабых сигналов.

#### § 4. Электрическая стимуляция клеток и измерение мембранной проводимости

Для измерения электрического сопротивления клеточных мембран, стимуляции возбудимых клеток, ионофоретической инъекции веществ возникает необходимость пропускать ток через микроэлектрод. В этих случаях в клетку вводят два микроэлектрода (рис. 54),

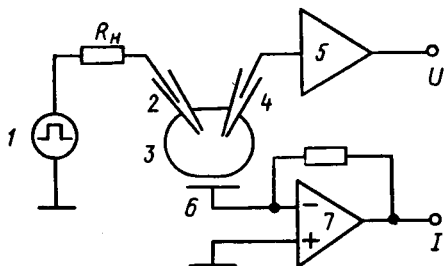


Рис. 54. Схема измерений мембранного сопротивления клетки:

1 — генератор импульсов, 2 — токовый микроэлектрод, 3 — клетка, 4 — измерительный микроэлектрод, 5 — предусилитель, 6 — электрод сравнения, 7 — измеритель тока;  $U$  — напряжение на мембране,  $I$  — трансмембранный ток

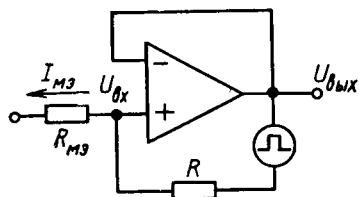


Рис. 55. Принцип стабилизации тока, текущего через микроэлектрод:

$R_{мэ}$  — сопротивление микроэлектрода,  $I_{мэ}$  — ток через микроэлектрод

один из которых служит для пропускания тока, а второй — для измерения сдвигов мембранного потенциала, вызываемых током известного значения. В цепь электрода сравнения включают регистратор тока. При измерениях сопротивления импульсы тока должны быть невелики, чтобы не вызывать изменения свойств мембраны.

**Стабилизация тока.** Трудность получения тока постоянного значения вызвана тем, что сопротивление микроэлектрода меняется в зависимости от силы и направления тока. Наиболее простой способ стабилизации состоит в том, что в цепь между токовым микроэлектродом и генератором импульсов включают резистор  $R_n$ , намного превышающий сопротивление микроэлектрода и объекта. В таком случае сила тока равна  $E/R_n$ , где  $E$  — напряжение на генераторе. Однако на расчетные значения тока следует полагаться с осторожностью. При случайной закупорке микроэлектрода его сопротивление может превысить  $R_n$  и ток в цепи окажется намного меньше расчетного. Поэтому силу тока контролируют по падению напряжения на известном сопротивлении или, что предпочтительнее, с помощью преобразователя ток — напряжение.

Более совершенен способ стабилизации тока на основе активных схем с операционными усилителями. Рис. 55 иллюстрирует принцип работы стабилизатора тока. По закону Ома для участка цепи, содержащей ЭДС  $E$ , можно записать

$$U_{вх} - U_{вых} = IR + E.$$

Для повторителя  $U_{вх} = U_{вых}$ ; следовательно,  $IR = -E$ , т. е. к сопротивлению  $R$  приложено все напряжение управляющего источника. Весь ток, проходящий через сопротивление  $R$ , пойдет через микроэлектрод и клетку, но не будет затекать в высокоомный вход усилителя. Сила тока составит  $E/R$ . Конкретные конструкции стабилизатора тока приведены в рекомендуемой литературе.

**Одноэлектродные мостовые схемы.** Одноэлектродные методы, предназначенные для одновременных измерений потенциала, сопротивления и электрической стимуляции клетки, почти во всех отношениях уступают двухэлектродному методу. Эти схемы используют главным образом при работе с мелкими клетками в связи с трудностью или невозможностью ввести в них два микроэлектрода. При одноэлектродных измерениях основная проблема состоит в том, что протекающий ток создает падение напряжения как на клеточной мембране, так и на микроэлектроде, сумма которых и регистрируется предусилителем. Так как падение напряжения на микроэлектроде не несет информации о биологическом объекте, данный компонент необходимо исключить из сигнала на выходе усилителя. Эту цель и преследует применение балансных мостовых схем.

В наиболее простой и наименее совершенной методике используют пассивный мост сопротивлений (рис. 56, А).

Ток проходит от генератора импульсов в микроэлектрод через большое сопротивление  $R_H$ , которое вместе с сопротивлением микроэлектрода  $R_{мэ}$  образует два плеча моста. Другие два плеча образованы делителем напряжения  $R_6$ . Перед введением микроэлектрода в клетку мост балансируют делителем  $R_6$  так, чтобы напряжения, поступающие на входы дифференциального усилителя, были одинаковы, а потенциал на выходе схемы — равен нулю. Таким образом, падение напряжения на микроэлектроде компенсируется равным по значению напряжением, снимаемым с балансирующего делителя.

На первый взгляд, схема позволяет легко измерять потенциал клетки при пропускании тока. Однако недостаток конструкции состоит в том, что резистор  $R_H$  включен параллельно входу усилителя и тем самым снижает его входное сопротивление. Для того чтобы шунтирование входа усилителя не приводило к ослаблению входного сигнала, сопротивление  $R_H$  должно быть очень большим, порядка 1 ГОм. Увеличение  $R_H$  приводит к нежелательному замедлению зарядки паразитной емкости микроэлектрода и затягиванию фронта импульса тока. Из-за расхождения формы импульсов, снимаемых с мик-

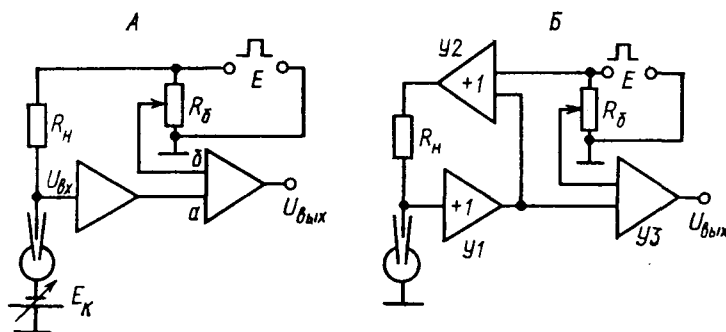


Рис. 56. Мостовые одноэлектродные схемы для пропускания тока и регистрации мембранного потенциала. А — простейшая схема; Б — схема с активными элементами:

$E$  — командное напряжение, определяющее силу тока через микроэлектрод.  $R_H$  — сопротивление нагрузки ( $\sim 1$  ГОм); остальные объяснения см. в тексте

роэлектрода и делителя  $R_6$ , на выходе схемы в момент включения и выключения стимула появляются кратковременные выбросы, осложняющие измерения.

Кроме того, через сопротивление  $R_n$  возникает дополнительный ток утечки силой  $E'_{кл}/R_n$ , где  $E_{кл}$  — потенциал покоя, который может необратимо повреждать клетку. Для устранения тока утечки в цепь между электродом сравнения и заземлением включают дополнительный источник, ЭДС которого должна быть равна потенциалу клетки. Поскольку любые изменения потенциала клетки, как спонтанные, так и вызванные пропуском тока, приводят к возобновлению тока утечки, в ходе опыта необходимо непрерывно подстраивать напряжение компенсации  $E_n$ .

Современные одноэлектродные устройства на основе активных мостовых схем (рис. 56, Б) исключают протекание тока утечки и обеспечивают автоматическое вычитание падения напряжения на микроэлектроте. В отсутствие тока (при нулевом напряжении генератора) потенциал на входе усилителя  $U_1$  равен потенциалу покоя клетки  $E_{кл}$ . Если усилители  $U_1$  и  $U_2$  работают в режиме повторения с коэффициентом усиления, равным единице, то напряжение на выходе  $U_1$  равно  $E_{кл}$  и сигнал на выходе  $U_3$  отражает величину  $E_{кл}$ . Напряжение на выходе  $U_2$  также равно  $E_{кл}$ ; потенциалы на двух выводах резистора  $R_n$  одинаковы, и ток через  $R_n$  не течет.

Ток начинает проходить в момент включения командного напряжения  $E$ . При этом потенциал на выходе  $U_2$  сразу станет отличаться от потенциала на входе  $U_1$  на значение командного напряжения  $E$ . В результате через резистор  $R_n$  и микроэлектрод потечет стабилизированный ток  $I = E/R_n$ . Этот ток вызывает падение напряжения на микроэлектроте и, кроме того, смещает  $E_{кл}$  до нового уровня  $E'_{кл}$ . Суммарный сигнал  $E'_{кл} + IR_{мэ}$  воспроизводится повторителем  $U_1$  и поступает на вход  $a$  усилителя  $U_3$ . Для балансировки моста делитель  $R_6$  подстраивают так, чтобы сигнал на входе  $b$  усилителя  $U_3$  был в точности равен падению напряжения на микроэлектроте. Таким образом удастся измерять мембранный потенциал, не маскируемый падением напряжения на микроэлектроте.

**Электротонический потенциал и кабельные свойства волокон.** При пропускании постоянного тока через микроэлектрод, введенный в центральную часть узкой цилиндрической клетки, такой, как нервное или мышечное волокно, плотность трансмембранного тока убывает с увеличением расстояния от места расположения микроэлектрода. Протекание тока через мембрану волокна создает убывающий с расстоянием *электротонический потенциал*. Волокно обнаруживает сходство с коаксиальным кабелем, обладающим утечкой. Расстояние, на котором электротонический сдвиг мембранного потенциала уменьшается в  $e$  раз по отношению к сдвигу потенциала в области инъекции тока, называют *постоянной длины волокна  $\lambda$* . Чем больше проводимость мембраны и хуже изолирующие свойства кабеля, тем меньше  $\lambda$ . При электрическом возбуждении волокон происходит снижение сопротивления мембраны и соответственно уменьшается  $\lambda$ . Для клеток харовых водорослей постоянная длины составляет в покое примерно 1 см, а при возбуждении уменьшается до 2—3 мм.

Стационарное распределение электротонического потенциала в кабеле бесконечной длины описывается уравнением

$$d^2 \varphi / dx^2 = \varphi / \lambda^2, \quad (IV.4.1)$$



где  $\varphi$  — электротонический потенциал, измеряемый по отношению к уровню потенциала покоя,  $x$  — расстояние по оси клетки.  $\lambda$  зависит от проводимости мембраны, а также электропроводности наружной и внутренней среды:

$$\lambda^2 = r_m / (r_i + r_o),$$

где  $r_m$  — сопротивление мембраны на единицу длины;  $r_i$  и  $r_o$  — сопротивление внутренней и внешней среды на единицу длины клетки. При  $r_o \ll r_i$   $\lambda = \sqrt{r_m / r_i}$ . Решение уравнения (IV.4.1) имеет вид

$$\varphi = \varphi_0 \exp(-x/\lambda).$$

Видно, что электротонический потенциал уменьшается с увеличением расстояния, ослабляясь до  $\varphi_0/e$  при  $x = \lambda$ .

При анализе переходных процессов, вызванных пропусканием импульсов тока, следует учитывать, что электротонический потенциал является функцией двух переменных: координаты  $x$  и времени  $t$ . Распределение электротонического потенциала во времени по длине клетки описывается уравнением

$$\frac{\partial^2 \varphi}{\partial x^2} = \frac{\varphi}{\lambda^2} + \frac{\tau}{\lambda^2} \frac{\partial \varphi}{\partial t},$$

где  $\tau = r_m C_m$  — постоянная времени клеточной мембраны.

На основе кабельной теории разработан относительно простой метод измерения сопротивления и емкости цилиндрической клетки конечных размеров с помощью двух микроэлектродов. В середине клетки, общая длина которой составляет  $2l$ , вводят токовый микроэлектрод; точке инъекции тока соответствует координата  $x = 0$ . Если ввести измерительный микроэлектрод на расстоянии  $0,38l$  от места нахождения токового электрода, то полное сопротивление клеточной мембраны будет определяться выражением, по форме совпадающим с законом Ома:  $R = r_m/l = U(x_{кр})/I(0)$ , где  $U(x_{кр})$  — электротонический потенциал, измеряемый на критическом расстоянии  $x = 0,38l$ ;  $I(0)$  — сила тока, пропускаемого через микроэлектрод. Сопротивление мембраны на единицу длины  $r_m$  имеет размерность Ом·см,  $R$  выражено в омах. Из кинетической кривой нарастания электротонического потенциала в точке  $x = 0,38l$  при пропускании прямоугольного импульса тока можно непосредственно оценить постоянную времени мембраны ( $\tau$ ). За время  $\tau$  электротонический потенциал достигает 0,63 максимального значения. Критическое расстояние  $0,38l$  рассчитано для клеток харовых водорослей, у которых  $l/\lambda = 0,5 \div 3,0$ . Значение  $x_{кр}$  несколько варьирует в зависимости от сопротивления торцов клетки.

Для измерения пассивных электрических свойств волокон можно использовать и другие методы, однако в этом случае необходимо равномерное протекание тока через клеточную поверхность. Для этой цели в крупные нервные волокна вводят центральный осевой электрод, а снаружи помещают другой металлический электрод,

что обеспечивает эквипотенциальность внутренней и наружной среды.

**Метод изолирующих мостиков.** Введение осевого электрода на всю длину клетки представляет сложную, а иногда и невыполнимую задачу. Гораздо проще создать равномерную плотность тока на небольшом участке, отделенном от остальной поверхности клетки изолирующими перегородками. Этот прием широко используют при работе с клетками харовых водорослей. Длинную изолированную клетку помещают в камеру с тремя отсеками. Промежутки между отсеками заполнены вазелином, который обеспечивает электрическую изоляцию между растворами в центральном и боковых отсеках (рис. 57). При наложении разности потенциалов между боковыми электродами и электродом, находящимся в центральном отсеке, путь тока замыкается через клетку. Так как ширина зазора между изолирующими перегородками (2—3 мм) существенно меньше постоянной длины  $\lambda$ , плотность мембранного тока на центральном изолированном сегменте клетки будет равномерной. Мембранный потенциал изолированного участка и изменения, вызванные пропусканием тока, регистрируют с помощью единственного внутриклеточного микроэлектрода. В опытах с мышечными волокнами в качестве изолирующей среды используют раствор сахарозы. Применение изолирующих мостиков позволяет осуществлять электрическую стимуляцию возбудимых клеток, измерять их сопротивление и емкость.

Если центральный участок клетки харовой водоросли предварительно деполяризовать 0,1 М раствором KCl, то, пропуская на этом участке входящий ток, можно наблюдать гиперполяризационный ответ, заключающийся в скачкообразном увеличении мембранного

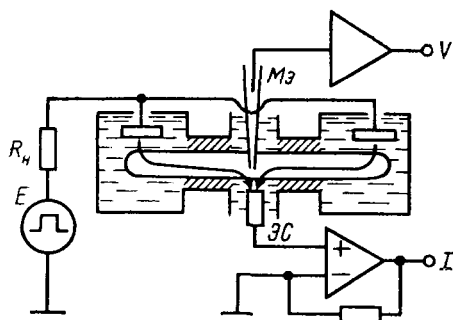


Рис. 57. Трансклеточное пропускание тока с помощью изолирующих мостиков:

Мэ — измерительный микроэлектрод, ЭС — электрод сравнения, V — измеряемый мембранный потенциал, I — регистрируемый трансмембранный ток, R<sub>н</sub> — сопротивление нагрузки (~1 ГОм), E — генератор прямоугольных импульсов

сопротивления и переходе мембранного потенциала на более отрицательный уровень. Изменение сопротивления мембраны при гиперполяризационном ответе (в общем случае при пропускании постоянного тока) измеряют путем наложения на фиксированный ток дополнительной низкоамплитудной переменной составляющей. При протекании через мембрану электрического тока  $I$  мембранный потенциал можно представить в виде суммы омического падения напряжения  $IR_m$  и эффективной ЭДС мембраны  $E$ :  $V = IR_m + E$ ,

где  $R_m$  — мембранное сопротивление. Сопротивление  $R_m$  или обратную величину — проводимость  $g_m$  — рассчитывают по закону Ома:  $R_m = g_m^{-1} = \Delta V / \Delta I$ , где  $\Delta V$  — смещения потенциала клетки, вызываемые слабыми импульсами тока  $\Delta I$ .

### Определение мембранной емкости.

Эквивалентная схема рассмотренной цепи показана на рис. 58. Здесь  $R_m$  и  $C_m$  обозначают сопротивление и емкость мембраны,  $R_n$  — резистор, стабилизирующий ток в цепи. Сопротивление утечки  $R_y$  отражает протекание небольшой части тока в обход клетки по границе с изолирующим слоем. Сопротивление наружной среды и электрода сравнения, находящегося в центральном отсеке, объединены на схеме в резистор  $R_c$ . Включение напряжения  $E$  сопровождается заряджением емкости мембраны. При условии, что  $R_n \gg R_m$  и  $R_y \gg R_m$ , характерное время экспоненты  $\tau$  равно  $R_m C_m$ . При плохом качестве изоляции между отсеками камеры (низкое  $R_y$ ) экспериментальное значение  $\tau$  окажется заниженным по сравнению с постоянной времени мембраны  $R_m C_m$ . Фазе плавного нарастания потенциала до максимума может предшествовать небольшой быстрый скачок потенциала, обусловленный падением напряжения на суммарном сопротивлении среды и внешнего электрода сравнения  $R_c$ .

Падение напряжения на внешнем электроде сравнения накладывается на измеряемый потенциал мембраны, что ограничивает точность измерений сопротивления и емкости по рассмотренным выше схемам. Ошибку измерений можно дополнительно понизить, разделив полностью токовую и измерительную цепи. Для этого вводят дополнительный электрод, а электрод сравнения изолируют от общего заземления (рис. 59). Стандартный прием состоит в том, что потенциалы измерительного микроэлектрода и электрода сравнения измеряют двумя предусилителями, а затем находят разностный сигнал.

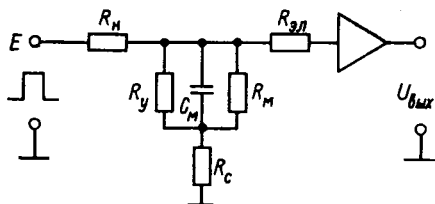


Рис. 58. Эквивалентная схема измерительной и токовой цепей в методе изолирующих мостиков

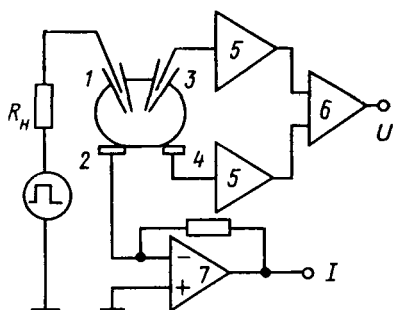


Рис. 59. Измерение электрических параметров клетки четырехэлектродным методом (с использованием двух микроэлектродов):

1, 2 — токовые электроды, 3, 4 — измерительные электроды, 5 — электрометрические усилители, 6 — дифференциальный усилитель, 7 — регистратор тока,  $R_n$  — резистор, стабилизирующий ток в цепи

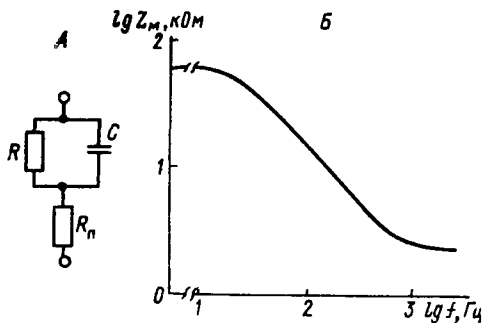


Рис. 60. Частотная зависимость импеданса мембраны харовых водорослей. А — эквивалентная схема мембраны с последовательным сопротивлением ( $R_n$ ) внешней среды; Б — зависимость модуля импеданса ( $Z_m$ ) от частоты переменного тока, пропускаемого через мембрану

**Измерения на переменном токе.** Для тестирования пассивных электрических характеристик клеточных мембран наряду с постоянным током используют переменный ток различных частот. Оба подхода — анализ изменений потенциала в ответ на пропускание ступени тока и построение частотных зависимостей импеданса клеток — достаточно схожи, хотя измерения на переменном токе в широком диапазоне частот несут большую информацию об эквивалентной электрической схеме

мембранной системы и механизмах ионного транспорта.

Для измерений импеданса с помощью четырехэлектродной схемы (рис. 59) через клетку пропускают переменный ток известного значения и регистрируют падение напряжения на мембране, создаваемое этим током. *Импедансом мембраны*  $Z$  называют ее комплексное сопротивление для переменного тока частоты  $\omega$ :

$$Z = R_\omega + iX_\omega.$$

В простейшем случае частотная зависимость импеданса клетки описывается эквивалентной схемой, включающей параллельно соединенные элементы  $R$  и  $C$ , а также последовательно соединенное сопротивление  $R_n$  внутренней и внешней среды (рис. 60, А). Импеданс параллельного участка цепи  $Z'$ , определяемый условием  $1/Z' = 1/R + i\omega C$ ,

$$Z' = \frac{R}{1 + \omega^2 C^2 R^2} - i \frac{\omega C R^2}{1 + \omega^2 C^2 R^2}.$$

С учетом  $R_n$  действительная часть импеданса всей цепи составит

$$R_\omega = R_n + R / (1 + \omega^2 C^2 R^2).$$

В эксперименте измеряется модуль импеданса, численно равный сумме векторов  $R_\omega$  и  $X_\omega$ :  $Z_m = \sqrt{R_\omega^2 + X_\omega^2}$ . Подставляя выражения для  $R_\omega$  и  $X_\omega$ , получим

$$Z_m = \left( R_n^2 + \frac{R(2R_n + R)}{1 + R^2 \omega^2 C^2} \right)^{1/2}. \quad (\text{IV.4.2})$$

Зависимость модуля импеданса от частоты, описываемая этим уравнением, показана на рис. 60, Б. На высоких частотах  $Z_m = R_n$ , т. е. все напряжение падает на водном растворе, окружающей клетку. На постоянном токе  $Z_m = R_n + R$ . Частотно-зависимый спад импеданса определяется ростом проводимости конденсатора с повышением частоты. Для линейного участка спада  $Z_m$  в логарифмических координатах угловой коэффициент близок к  $-1$ , т. е. при возрастании частоты на один порядок происходит 10-кратное уменьшение импеданса. Соблюдение данного условия в эксперименте свидетельствует об адекватности упрощенной эквивалентной схемы мембраны для рассматриваемого частотного диапазона.

По измерениям импеданса на линейном участке спада  $Z_m$  можно рассчитать емкость мембраны. Формула для расчета получается из соотношения (IV.4.2):

$$C = \frac{1}{\omega R} \left( \frac{(R + R_n)^2 - Z_m^2}{Z_m^2 - R_n^2} \right)^{1/2}.$$

Простейшая эквивалентная схема клетки часто оказывается недостаточной для объяснения электрических свойств клеток на переменном токе. В соответствии с этим кривые зарядки мембранной емкости при пропускании постоянного тока в ряде случаев лучше аппроксимируются суммой двух экспонент. Для интерпретации свойств растительных клеток привлекают сложные эквивалентные схемы. Это обусловлено существованием двух последовательно расположенных мембран — плазмалеммы и тонопласта, а также неоднородностью свойств мембраны в пределах одной клетки. Пространственная неоднородность емкости и проводимости установлена для клеток харовых водорослей, которые в определенных условиях формируют у поверхности чередующиеся кольцевые зоны выделения и поглощения  $H^+$ . Дополнительным фактором, объясняющим расхождение частотных характеристик целой клетки и простейшего электрического аналога, служит зависимость емкости клеточных мембран от частоты пропускаемого тока.

## § 5. Ионные токи возбудимых мембран

Современные представления о механизмах транспорта ионов через мембраны возбудимых клеток сложились главным образом на основе данных, полученных *методом фиксации напряжения*. Сущность метода состоит в измерении токов, протекающих через клеточную мембрану в условиях, когда мембранный потенциал автоматически с помощью усилителя обратной связи поддерживается на любом заданном уровне.

В покоящейся клетке ток через мембрану не течет, так как сумма токов, переносимых ионами разных видов, равна нулю. При сме-

шении потенциала от уровня потенциала покоя возникает трансмембранный ток, который состоит из емкостного и ионного токов:

$$I_M = C_M dV/dt + I,$$

где  $I_M$  — суммарный ток;  $C_M dV/dt$  — ток зарядки мембранной емкости;  $I$  — ионный ток. Типичный эксперимент по фиксации напряжения состоит в том, что разность потенциалов между внутренней и наружной средой клетки изменяют скачком до нового значения и, поддерживая потенциал на заданном уровне, регистрируют динамику электрического тока, текущего через мембрану. В момент ступенчатого переключения потенциала происходит быстрая перезарядка  $C_M$ ; при этом регистрируется волна емкостного тока. За доли или сотые доли миллисекунды устанавливается новое значение мембранного потенциала, емкостный ток прекращается (так как  $dV/dt = 0$ ) и измеряется только ток, обусловленный движением ионов через мембрану.

**Компоненты ионного тока.** В классических исследованиях А. Ходжкина и А. Хаксли, выполненных на гигантских аксонах кальмара, установлено, что суммарный ионный ток, текущий через мембрану после ступенчатой деполяризации, складывается из трех компонентов: быстрого  $Na^+$ -тока, задержанного  $K^+$ -тока и постоянного во времени и небольшого по значению тока утечки.

Проводимость утечки не зависит от мембранного потенциала. Ходжкин и Хаксли объясняли появление тока утечки движением ионов через поврежденную область мембраны. Для измерения тока утечки обычно сдвигают мембранный потенциал в сторону гиперполяризации. В этом случае после кратковременной волны емкостного тока регистрируется постоянный ток утечки (рис. 61). При сту-

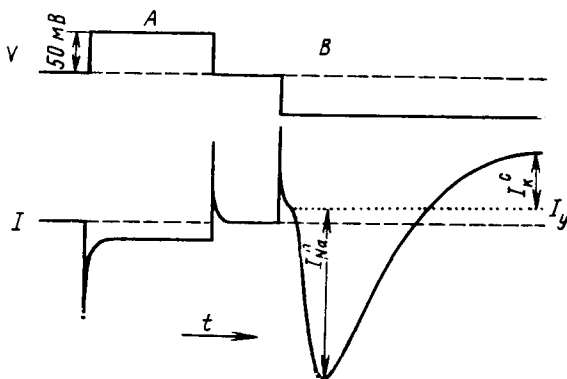


Рис. 61. Изменения мембранного тока ( $I$ ) в аксоне при наложении гиперполяризующего импульса ( $A$ ) и деполяризующей ступени напряжения ( $B$ )

При гиперполяризации мембраны после волны емкостного тока регистрируется постоянный входящий ток утечки; при деполяризации развивается ионный ток, включающий натриевый и калиевый компоненты, а также постоянный по величине ток утечки  $I_y$ ;  $I_{Na^+}$  — пиковое значение  $Na^+$ -тока;  $I_K^+$  — стационарное значение калиевого тока

пенчатой деполаризации помимо тока утечки развиваются токи  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$ , характеризующиеся сложной кинетикой.

Натриевый и калиевый токи развиваются независимо, поэтому с помощью различных приемов удается разделить суммарную кривую ионного тока на компоненты и охарактеризовать по отдельности свойства системы  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  проводимости. Так, при замене в среде  $\text{Na}^+$  на непроницающие катионы холина  $\text{Na}^+$ -компонент ионного тока практически исчезает и регистрируется только  $\text{K}^+$ -ток, имеющий выходящее направление

Суммарный ионный ток в аксонах удается разделить на компоненты и с помощью *блокаторов  $\text{Na}^+$ - и  $\text{K}^+$ -каналов.*

Натриевый ток подавляется тетродотоксином,  $\text{K}^+$ -ток исчезает при введении внутрь аксона тетраэтиламмония, высоких концентраций  $\text{Cs}^+$ , а также при обработке волокон 4-аминопиридином. С помощью блокаторов  $\text{Na}^+$ - и  $\text{K}^+$ -токов удалось вычленить  $\text{Ca}^{2+}$ -токи в мембране нейронов и подробно охарактеризовать свойства  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов. К блокированию ионных токов прибегают и для вычленения воротных токов, связанных с открыванием каналов.

**Потенциал реверсии ионного тока.** В опытах на аксонах кальмара установлено, что потенциал, при котором начальный ионный ток изменяет свое направление, близок по величине к равновесному потенциалу для  $\text{Na}^+$ , рассчитываемому по формуле Нернста (IV.1.3). Этот результат, легко объяснимый на основании принятой эквивалентной схемы мембраны (рис. 62), показывает, что в том случае, когда мембранный потенциал равен равновесному потенциалу  $\text{Na}^+$  ( $E_{\text{Na}}$ ), движущая сила для  $\text{Na}^+$  равна нулю. Поэтому действующую силу, определяющую направление движения ионов через мембрану, можно выразить в виде разности между мембранным потенциалом  $V$  и равновесным потенциалом для данного иона  $E_i$ . Для  $\text{Na}^+$  действующая сила равна  $V - E_{\text{Na}}$ .

**Ионные проводимости возбудимой мембраны.** Так как после ступенчатого смещения мембранного потенциала на заданный уровень действующая сила постоянна, очевидно, что изменения тока  $\text{Na}^+$  обусловлены изменением проводимости мембраны для  $\text{Na}^+$ :

$$I_{\text{Na}} = g_{\text{Na}} (V - E_{\text{Na}}).$$

Таким образом, если суммарная кривая мембранного тока разделена на компоненты, то можно проследить изменения проводимости мембраны для  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  во времени:

$$g_{\text{Na}} = I_{\text{Na}} / (V - E_{\text{Na}}); \quad g_{\text{K}} = I_{\text{K}} / (V - E_{\text{K}}).$$

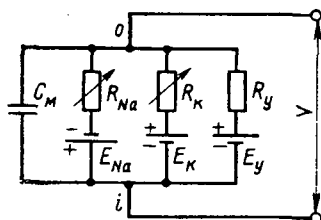


Рис. 62. Эквивалентная схема мембраны аксона:

$o$  и  $i$  — обозначения наружного раствора и аксоплазмы;  $C_m$  — емкость мембраны;  $1/R_{\text{Na}}$  и  $1/R_{\text{K}}$  — проводимости мембраны для  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$ ;  $1/R_y$  — проводимость утечки;  $E_{\text{Na}}$  и  $E_{\text{K}}$  — равновесные потенциалы для  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$ ;  $E_y$  — потенциал реверсии тока утечки;  $V$  — напряжение на мембране

Сумма парциальных ионных проводимостей  $g_i$  равна общей проводимости мембраны.

Проводимость для иона  $i$ , определяемую соотношением  $g_i = I_i / (V - E_i)$ , называют *хордовой проводимостью*. Ее следует отличать от *дифференциальной проводимости*  $G_i$ , определяемой по углу наклона вольт-амперной характеристики:  $G_i = dI_i/dV$ . Их различие можно рассмотреть на примере вольт-амперной кривой для пикового  $\text{Na}^+$ -тока.

Пусть максимальный входящий ток соответствует пиковому значению  $\text{Na}^+$ -тока  $I_{\text{Na}}^n$ , а установившийся выходящий ток соответствует стационарному  $\text{K}^+$ -току  $I_{\text{K}}^c$  (см. рис. 61). Разделение  $\text{Na}^+$ - и  $\text{K}^+$ -токов во времени подтверждено многочисленными опытами. Откладывая значения  $I_{\text{Na}}^n$  и  $I_{\text{K}}^c$  в виде зависимости от величины фиксируемого мембранного потенциала, получают соответствующие вольт-амперные характеристики (рис. 63). Для произвольно выбранного потенциала  $V$  значение  $g_{\text{Na}}$  определяется как тангенс угла наклона прямой, проведенной в точку  $a$  от потенциала нулевого тока  $E_{\text{Na}}$ , по отношению к оси напряжений. Проводимость  $g_{\text{Na}}$  всегда положительна, а направление тока (положительным принято считать выходящий ток) определяется знаком разности:  $V - E_{\text{Na}}$ .

Проводимость  $G_{\text{Na}}$  ( $G_{\text{Na}} = dI_{\text{Na}}^n/dV$ ) определяется наклоном касательной к вольт-амперной кривой по отношению к оси потенциалов. Проводимость  $G_{\text{Na}}$  может принимать как положительные, так и отрицательные значения. Падающему участку вольт-амперной характеристики  $\text{Na}^+$ -тока соответствуют отрицательные значения проводимости  $G_{\text{Na}}$ . В связи с этим участок отрицательного наклона вольт-амперной кривой называют *участком отрицательного сопротивления*.

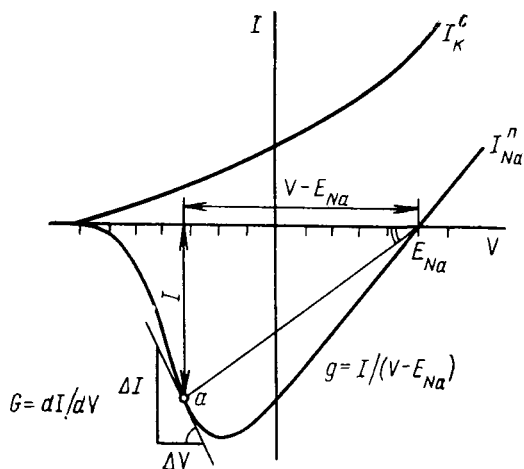


Рис. 63. Вольт-амперные характеристики для пикового  $\text{Na}^+$ -тока ( $I_{\text{Na}}^n$ ) и стационарного  $\text{K}^+$ -тока ( $I_{\text{K}}^c$ ):

$g$  — хордовая проводимость,  $G$  — дифференциальная проводимость,  $I$  — ток,  $V$  — потенциал на мембране



**Кинетика ионных токов.** Значения проводимостей  $g_{Na}$  и  $g_K$  изменяются во времени и зависят от потенциала. При ступенчатой деполяризации мембраны  $g_{Na}$  быстро возрастает до максимума, а затем снижается до низкого постоянного уровня. В отличие от этого  $g_K$  возрастает от низкого уровня до стационарного максимального уровня. Хотя нарастание  $g_{Na}$  происходит гораздо быстрее, чем нарастание  $g_K$ , оба процесса развиваются после некоторого периода задержки.

В мембране на единичной площади поверхности содержится ограниченное число проводящих элементов. Поэтому, если все проводящие каналы открыты, достигается максимальный уровень проводимости, обозначаемый  $\bar{g}_{Na}$  и  $\bar{g}_K$  для ионов Na и K. Промежуточные состояния проводимости, при которых открыта лишь часть проводящих элементов, удобно представить в виде произведения максимальной проводимости, на безразмерные параметры, варьирующие в пределах от нуля до единицы. Параметры, определяющие уровень  $Na^+$ -проводимости, получили название  $m$  и  $h$ ; уровень  $K^+$ -проводимости определяется параметром  $n$ . При ступенчатом смещении мембранного потенциала каждый из этих параметров совершает относительно медленный переход к новому равновесному значению.

Изменение  $m$ ,  $n$  и  $h$  можно формально рассматривать как следствие перераспределения некоторых заряженных внутримембранных частиц между внутренней и наружной границами мембраны под действием электрического поля. Используя такую интерпретацию, значения  $m$  и  $n$  рассматривают как вероятность нахождения положительно заряженных  $m$ - и  $n$ -частиц у внешней поверхности мембраны. При больших отрицательных потенциалах все положительно заряженные подвижные частицы сосредоточены у внутренней поверхности мембраны; этому состоянию соответствуют значения  $m$  и  $n$ , равные нулю, и значение  $h$ , равное единице. При ступенчатой деполяризации клетки управляющие частицы начинают переходить к внешней поверхности, причем  $m$ -частицы перемещаются на порядок быстрее, чем  $n$ - и  $h$ -частицы. Такой переход соответствует увеличению параметром  $m$  и  $n$  и уменьшению параметра  $h$ .

Увеличение  $m$  после ступенчатой деполяризации описывает фазу нарастания  $g_{Na}$ , т. е. активацию  $Na^+$ -проводимости; медленное уменьшение  $h$  описывает фазу спада  $g_{Na}$ , т. е. инактивацию  $Na^+$ -проводимости. Увеличение  $n$  отвечает активации  $K^+$ -проводимости.

В модели Ходжкина и Хаксли мембранный ток изображают в виде суммы емкостного тока,  $Na^+$ -тока,  $K^+$ -тока и тока утечки:

$$I_m = C_m \frac{dV}{dt} + \bar{g}_{Na} m^3 h (V - E_{Na}) + \bar{g}_K n^4 (V - E_K) + \bar{g}_y (V - E_y),$$

где  $m$ ,  $n$  и  $h$  описываются однотипными уравнениями

$$dm/dt = \alpha_m (1 - m) - \beta_m m.$$

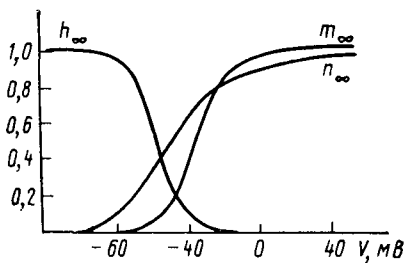


Рис. 64. Стационарные значения параметров  $m$ ,  $n$  и  $h$  при различных мембранных потенциалах в аксоне кальмара

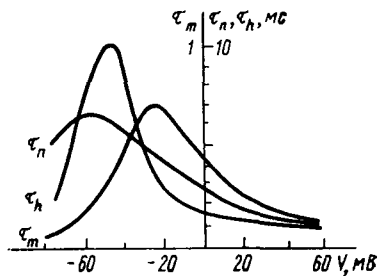


Рис. 65. Зависимость параметров  $\tau_m$ ,  $\tau_n$  и  $\tau_h$  для аксона кальмара от мембранного потенциала  $V$ . Значения  $\tau_m$  отложены в шкале 0-1 мс, значения  $\tau_n$  и  $\tau_h$  - в шкале 0-10 мс

Константы скорости  $\alpha_m, \alpha_n, \alpha_h, \beta_m, \beta_n, \beta_h$  отражают переходы заряженных  $m$ -,  $n$ - и  $h$ -частиц в прямом и обратном направлениях через мембрану под влиянием тепловых флуктуаций и электрического поля. Изменение напряженности электрического поля облегчает переходы в одном из направлений и затормаживает переходы в противоположную сторону. Решение уравнения имеет вид

$$m = m_\infty - (m_\infty - m_0) \exp(-t/\tau_m),$$

где  $m_\infty = \alpha_m / (\alpha_m + \beta_m)$ ;  $\tau_m = 1 / (\alpha_m + \beta_m)$ .

Зависимость параметров  $m_\infty, n_\infty$  и  $h_\infty$  от потенциала приведена на рис. 64, а зависимость постоянных времени  $\tau_m, \tau_n, \tau_h$  от напряжения показана на рис. 65.

Уравнения Ходжкина — Хаксли с небольшими модификациями оказались пригодными для описания ионных токов целого ряда возбудимых мембран. Данные метода фиксации напряжения используют для определения динамических и стационарных характеристик воротных процессов в ионных каналах, а также для построения кинетических моделей функционирования ионных каналов. Зависимость параметров  $\bar{g}, \tau, m_\infty, n_\infty$  и  $h_\infty$  от мембранного потенциала широко используют и для характеристики ионных каналов, модифицированных различными химическими агентами.

Если мембрану поддерживать в гиперполяризованном состоянии ( $m_0 = n_0 = 0, h_0 = 1$ ), а затем резко ее деполяризовать, то изменение  $m$  описывается формулой  $m = m_\infty (1 - e^{-t/\tau_m})$ . При достаточно большой деполяризации  $h_\infty = 0$  и  $h = e^{-t/\tau_h}$ . Поэтому кинетику  $\text{Na}^+$ -тока при достаточно большой деполяризации можно представить в виде

$$I = I_{\max} (1 - e^{-t/\tau_m})^3 e^{-t/\tau_h},$$

где

$$I_{\max} = \bar{g}_{\text{Na}} (V - E_{\text{Na}}).$$

Это уравнение описывает изменения ионного тока в условиях подавления  $\text{K}^+$ -тока. Дальнейшее упрощение кинетики ионных токов достигается при подавлении инактивации  $\text{Na}$ -тока проназой. В этом случае  $h$  не изменяется ( $h = 1$ ) и  $\text{Na}$ -ток изображается зависимостью

$$I = I_{\max} (1 - e^{-t/\tau_m})^3,$$

или в общем случае

$$I = I_{\max} (1 - e^{-t/\tau_m})^k,$$

где  $k$  может принимать значения от 2 до 4.

В модели Ходжкина — Хаксли активация и инактивация  $\text{Na}^+$ -каналов развиваются независимо. Однако вполне возможно, что при деполяризации мембраны  $\text{Na}^+$ -каналы сначала переходят из закрытого состояния в открытое и только затем в инактивированное. Активация и инактивация в этой модели связаны: канал может перейти в инактивированное состояние только предварительно открывшись. Аналитические зависимости для описания ионных токов, полученные с учетом различных состояний канала, обычно слишком громоздки и не универсальны.

## § 6. Техника стабилизации мембранного потенциала

На рис. 66 показаны схемы установок для фиксации мембранного потенциала на клетках сферической формы и длинных цилиндрических клетках. Эти схемы отличаются лишь по способу пропуска тока через клеточную мембрану. Мембранный потенциал, измеряемый повторителем напряжения, поступает на один из входов усилителя сравнения. На второй вход усилителя сравнения подается командное напряжение  $E$ . Выход усилителя сравнения подключен к токовому электроду. Система имеет цепь обратной связи, благодаря которой мембранный потенциал мгновенно устанавливается на уровне командного напряжения.

В момент ступенчатого переключения управляющего напряжения от уровня потенциала покоя до значения  $E$  на входе дифференциального усилителя возникает разность потенциалов  $E - V$ , которая, многократно усилившись, прикладывается к токовому электроду. При этом через токовый электрод и клетку потечет ток, который смещает потенциал на мембране и сводит к минимуму отличие мембранного потенциала от командного напряжения. Протекающий через мембрану ток регистрируют преобразователем ток — напряжение.

В приведенных схемах внешний электрод сравнения входит как в измерительную, так и в токовую цепи. Целесообразно применять два раздельных электрода, с тем чтобы исключить ошибку измерения мембранного потенциала, связанную с падением напряжения на внешнем электроде сравнения. Во всяком случае, если используется общий электрод, стремятся максимально понизить его собственное сопротивление, например за счет увеличения площади поверхности хлорируемой серебряной пластины. Ошибку фиксации мембранного потенциала, вызванную падением напряжения на электроде сравнения, можно оценить, умножая сопротивление электрода на максимальную силу тока в цепи. Ошибка не должна превышать 2—3 мВ.

При работе с клетками харовых водорослей и некоторыми многоклеточными препаратами (полоски сердечной мышцы) мембранный потенциал стабилизируют на небольшом участке поверхности, отделенном изолирующими перегородками от остальной части клетки или препарата. Длина изолированного участка должна быть меньше постоянной длины клетки, с тем чтобы обеспечить равномерное протекание тока и однородное смещение потенциала. Ширина зазора между изолирующими мостиками составляет, как правило, 2—5 мм.

Работу системы фиксации потенциала удобно рассмотреть на простой электрической схеме, в которой мембрана представлена в виде параллельной  $RC$ -цепи (рис. 67). Сравнение мембранного потенциала  $V$  с командным напряжением  $E$  осуществляется дифференциальным услителем, и ошибка  $E - V$ , усиленная в  $K$  раз, через цепь обратной связи подается на электрод и мембрану. При этом через мембрану и токовый микроэлектрод течет ток  $I$ . Напряжение

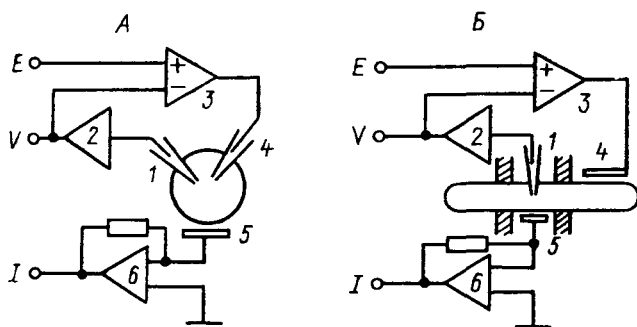


Рис. 66. Схемы установок для фиксации мембранного потенциала. *A* — с использованием двух микроэлектродов; *B* — с применением изолирующих мостиков:

*1* — измерительный микроэлектрод, *2* — повторитель напряжения, *3* — усилитель сравнения, *4* — токовый электрод, *5* — электрод сравнения, *6* — преобразователь тока в напряжение; *E* — командное напряжение, *V* — измеряемый мембранный потенциал, *I* — измеряемый трансмембранный ток

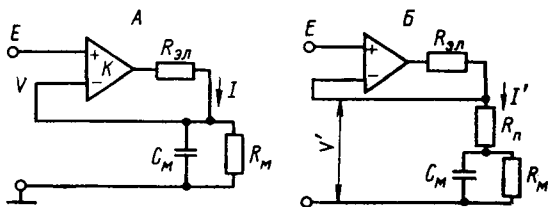


Рис. 67. Принципиальная схема фиксации мембранного потенциала. А, Б — без учета и с учетом последовательного сопротивления ( $R_n$ ):

$E$  — командное напряжение,  $V$  — мембранный потенциал,  $I$  — трансмембранный ток,  $R_{эл}$  — сопротивление токового электрода,  $K$  — коэффициент усиления усилителя сравнения,  $R_m$  и  $C_m$  — сопротивление и емкость мембраны,  $V'$  — суммарное напряжение на мембране и последовательном сопротивлении

на выходе усилителя равно сумме падения напряжения на токовом электроде и мембранного потенциала:

$$K(E - V) = R_{эл} I + V.$$

Отсюда  $V = E(K/K + 1) - R_{эл}I/(K + 1)$ .

Следовательно, эквивалентную схему цепи можно представить в виде замкнутого контура с источником ЭДС  $E_{экв} = EK / (K + 1)$ , резистором  $R_{экв} = R_{эл}/(K + 1)$  и  $RC$ -эквивалентом мембраны, на котором поддерживается напряжение  $V$ .

Если  $K \gg 1$ , то  $E_{экв} = E$  и потенциал на мембране является результатом деления командного напряжения между  $R_{экв}$  и импедансом мембраны  $Z$ . Импеданс параллельного соединения  $R$  и  $C$  равен

$$Z = \frac{R}{1 + \omega^2 C^2 R^2} - \frac{i\omega CR^2}{1 + \omega^2 C^2 R^2},$$

а модуль импеданса

$$Z_m = (1/R^2 + \omega^2 C^2)^{-1/2}.$$

На высоких частотах  $Z_m \approx 1/(\omega C)$ , т. е. импеданс определяется сопротивлением емкости. Стабилизация напряжения на мембране возможна при условии, что  $R_{экв} \ll Z_m$ , причем чем сильнее неравенство, тем меньше отклонение мембранного потенциала от  $E$ .

**Точность стабилизации мембранного потенциала.** Точность стабилизации потенциала на заданной частоте можно оценить количественно. Так как сила тока в цепи  $I = V/Z_m$ , то

$$K(E - V) = R_{эл} V/Z_m + V = V(R_{эл}/Z_m + 1).$$

Отсюда  $\delta = (E - V)/V = (1/K)(R_{эл}/Z_m + 1)$ ,

где  $\delta$  — относительная погрешность стабилизации. Уравнение отражает зависимость качества фиксации потенциала от коэффициента усиления  $K$  сопротивления токового микроэлектродов  $R_{эл}$  и электрических параметров объекта. Требования к быстродействию усилителя и его коэффициенту усиления

ния определяются скоростью развития ионных токов. Если ионный ток развивается за доли миллисекунды, необходимо обеспечить выход потенциала на стабильный уровень  $E$  за время около 10 мкс. Следовательно, электронная система должна обеспечить высокую точность стабилизации потенциала в области частот до  $f = (1/2) \text{ лт} \approx 20 \text{ кГц}$ .

В харовых водорослях ионный ток развивается медленно, от долей секунд до нескольких секунд. Поэтому могут быть использованы усилители с меньшим быстродействием и коэффициентом усиления  $\geq 10^3$ . Для изолированного сегмента харовой водоросли с сопротивлением  $R_M = 200 \text{ кОм}$  и емкостью  $0,1 \text{ мкФ}$  (площадь мембраны  $\sim 0,1 \text{ см}^2$ ) ошибка стабилизации напряжения на частоте  $1 \text{ кГц}$  при  $K = 10^5$  и сопротивлении токового микроэлектродов  $R_{эл} = 10^7 \text{ Ом}$  составит  $\sim 6\%$ .

**Влияние выходного напряжения усилителя.** Выходное напряжение усилителя сравнения равно сумме мембранного потенциала и падения напряжения на токоподводящем электроде:

$$U_{\text{вых}} = (V/Z_M) R_{эл} + V.$$

На высоких частотах импеданс мембраны определяется сопротивлением емкости  $Z_M \approx (2\pi f C_M)^{-1}$ . Поэтому условие стабилизации потенциала на высоких частотах имеет вид

$$U_{\text{вых}} = V(2\pi f C_M R_{эл} + 1).$$

С ростом частоты это условие обязательно нарушается, однако предельная частота, для которой оно еще соблюдается, зависит от  $U_{\text{вых}}$ . Из уравнения видно, что для повышения быстродействия системы необходимо иметь высокое  $U_{\text{вых}}$  или же относительно низкое  $R_{эл}$ . Это вызвано тем, что с ростом частоты уменьшается импеданс мембраны и все большая часть  $U_{\text{вых}}$  падает на сопротивлении токового микроэлектродов.

Используя приведенное уравнение, можно оценить верхний предел частот, на котором система успевает отслеживать изменения командного напряжения. Пусть необходимый диапазон фиксируемых напряжений составляет  $\pm 0,2 \text{ В}$ ; напряжение  $U_{\text{вых}}$  промышленных потенциостатов достигает  $200 \text{ В}$ . Тогда для изолированного участка харовой водоросли площадью  $0,1 \text{ см}^2$  ( $C_M = 0,1 \text{ мкФ}$ ) при сопротивлении  $R_{эл} = 10^7 \text{ Ом}$  максимальное значеные частоты стабилизации мембранного потенциала составляет  $\approx 170 \text{ Гц}$ . Расчеты показывают, что при напряжении выхода  $100 \text{ В}$  и сопротивлении микроэлектродов  $10^7 \text{ Ом}$  стабилизация напряжения в области  $\pm 100 \text{ мВ}$  в полосе  $20 \text{ кГц}$  возможна лишь на клетках с  $C_M$ , равной  $100 \text{ пФ}$ . Для клеток с емкостью  $0,1 \text{ мкФ}$  полоса частот, в которой достигается стабилизация потенциала, сужается до  $200 \text{ Гц}$ .

**Скорость установления потенциала.** В момент ступенчатого смещения командного напряжения ток в выходной цепи течет через микроэлектрод и мембранную емкость. Так как сопротивление емкости в этот момент намного меньше сопротивления микроэлектродов, подавляющая часть  $U_{\text{вых}}$  падает на микроэлектродов:

$$U_{\text{вых}} = K(E - V) \approx R_{эл} I = R_{эл} C_M dV/dt,$$

где  $I = C_M dV/dt$  — емкостной ток. Отсюда

$$V - E = -(R_{эл} C_M / K) dV/dt.$$

Решение уравнения имеет вид

$$V = E + (V_0 - E) e^{-t/\tau},$$

где  $t$  — время;  $V_0$  — потенциал, поддерживаемый до приложения командного импульса;  $E$  — командное напряжение;  $\tau = R_{эл} C_M / K$  — постоянная времени перехода мембранного потенциала к заданному уровню.

Таким образом, скорость зарядки мембраны до командного напряжения  $E$  зависит от сопротивления токового микроэлектрода, емкости объекта и усиления  $K$ . Чем больше коэффициент усиления, тем быстрее завершается переходный процесс, тем большее временное разрешение токов может быть достигнуто. В период до выхода мембранного потенциала на стационарный уровень ионные токи развиваются в условиях неконтролируемого потенциала. Существенное значение имеют и размеры клетки, поскольку емкость прямо пропорциональна площади ее поверхности.

**Влияние сопротивления изоляции.** При фиксации напряжения с помощью изолирующих мостиков — сахарозных, воздушных или вазелиновых — качество стабилизации потенциала зависит от сопротивления изоляции. При плохой изоляции возрастает ток утечки, протекающий между токовым электродом и электродом сравнения в обход клетки.

Для получения однородного потенциала на изолированном участке обычно стремятся уменьшить зазор между изолирующими перегородками, с тем чтобы длина изолированного сегмента клетки была меньше характеристической длины  $\lambda$ . Однако при уменьшении рабочего расстояния между изолирующими перегородками начинает сказываться диффузия сахарозы и солевых растворов. В результате нарушается однородность ионных концентраций по длине волокна и соответственно становятся неодинаковыми по длине препарата равновесные потенциалы для  $K^+$ ,  $Na^+$  и других ионов. Кроме того, диффузия электролита в изолирующие растворы сахарозы приводит к понижению сопротивления изоляции и возрастанию тока утечки.

**Влияние последовательного сопротивления  $R_{п}$ .** Основная ошибка метода фиксации напряжения обусловлена трудностью точного измерения потенциала мембраны в условиях протекания через нее тока. Это связано с тем, что протекающий ток создает падение напряжения не только на мембране, но и на окружающих слоях экстраклеточной и внутриклеточной среды, а также на любом другом сопротивлении, присутствующем в измерительной цепи на участке между отводящим микроэлектродом и электродом сравнения. В аксоне кальмара в качестве такого сопротивления, включенного последовательно с мембраной, выступает слой шванновских клеток (сопротивление  $\sim 5 \text{ Ом} \cdot \text{см}^2$ ). При протекании через мембрану аксона  $Na^+$ -тока плотностью  $\sim 4 \text{ мА/см}^2$  падение напряжения на слое шванновских клеток достигает 20 мВ, что составляет недопустимо большую величину. Именно на столько будет отличаться потенциал на аксомерме от командного напряжения.

В клетках харовых водорослей последовательно с плазмалеммой расположена внутренняя мембрана — тонопласт, отделяющая цитоплазму от центральной вакуоли. Сопротивление тонопласта в покое примерно на порядок меньше, чем у плазмалеммы, однако при возбуждении это соотношение, видимо, нарушается. Чтобы исключить ошибку фиксации потенциала, связанную с падением напряжения на тонопласте, измерительный микроэлектрод вводят в тонкий слой цитоплазмы. Другой подход состоит в разрушении тонопласта путем внутриклеточной перфузии растворами с  $Ca^{2+}$ -связывающим агентом — ЭГТА.

Сопротивление, расположенное последовательно с мембраной в цепи регистрации мембранного потенциала, неизбежно присутствует при любых модификациях метода фиксации напряжения. Погрешность фиксации потенциала, обусловленная  $R_{п}$ , равна произведению силы тока на  $R_{п}$ . Плотность ионного тока в аксонах кальмара достигает  $7 \text{ мА/см}^2$ ; в других возбудимых клетках она значительно меньше, и в клетках харовых водорослей составляет  $\sim 100 \text{ мкА/см}^2$ .

Неучитываемое  $R_{п}$  не должно оказывать существенного влияния на потенциал реверсии ионного тока при условии, что ток утечки пренебрежимо мал, поскольку при нулевом токе падение напряжения на  $R_{п}$  равно нулю. Вместе с тем ошибки, вызванные наличием  $R_{п}$ , недопустимы при изучении кинетики ионных токов и построении на этой основе моделей функционирования ионного канала.

Влияние  $R_{\Pi}$  проявляется также в искажении участка отрицательного наклона на вольт-амперной характеристике  $\text{Na}^+$ -тока в мембране нервных и мышечных волокон. Как видно из рис. 67, Б, фиксируемый потенциал  $V'$  отличается от напряжения на мембране. Ток в цепи равен  $I' = V' (R_{\Pi} + R_M)$ . В момент максимального развития  $\text{Na}^+$ -тока проводимость мембраны определяется проводимостью для  $\text{Na}^+$ , т. е.  $R_M \approx G_{\text{Na}}^{-1}$ , а суммарная проводимость мембраны и последовательного сопротивления равна

$$G' = (R_{\Pi} + 1/G_{\text{Na}})^{-1} = G_{\text{Na}} / (1 + R_{\Pi} G_{\text{Na}}).$$

Полученное выражение отражает наклон измеряемой вольт-амперной характеристики ( $G' = dI'/dV'$ ) и его отличие от наклона неискаженной вольт-амперной кривой  $\text{Na}^+$ -тока ( $G_{\text{Na}} = dI/dV$ ). Из уравнения видно, что при  $R_{\Pi} = 0$   $G' = G_{\text{Na}}$ . С увеличением  $R_{\Pi}$  наклон измеряемой нисходящей ветви вольт-амперной кривой становится круче, так как проводимость для падающего участка отрицательна ( $G_{\text{Na}} < 0$ ). При  $R_{\Pi} G_{\text{Na}} = -1$  падающий участок экспериментально не выявляется. Отсутствие участка отрицательного наклона на вольт-амперной характеристике  $\text{Na}^+$ -тока может свидетельствовать о несовершенстве методики стабилизации потенциала в связи с высоким значением  $R_{\Pi}$ .

Отклонение мембранного потенциала от командного напряжения особенно сильно проявляется в начальные моменты после ступенчатого сдвига командного напряжения, так как в период зарядки емкости мембраны большая часть фиксируемого напряжения падает на  $R_{\Pi}$ . С увеличением  $R_{\Pi}$  переходный процесс зарядки емкости затягивается, что проявляется в замедленном спаде емкостного тока после переключения командного напряжения.

Для оценки величины  $R_{\Pi}$  используют несколько приемов. Один из них основан на измерении постоянной времени спада емкостного тока ( $\tau = R_{\Pi} C_M$ ) после включения командного напряжения. Точному определению  $\tau$  может мешать воротный ток, который присутствует в суммарном токе зарядки емкости при деполаризации мембраны. Другой метод оценки  $R_{\Pi}$  заключается в измерении максимального значения емкостного тока. В первый момент после сдвига фиксируемого потенциала на величину  $\Delta V$  ток через мембрану лимитируется сопротивлением  $R_{\Pi}$ . Поэтому  $R_{\Pi} = \Delta V / I_{\text{max}}$ . Последовательное сопротивление можно оценить также по скачку напряжения при включении постоянного тока. Для ослабления мешающего влияния  $R_{\Pi}$  разработаны различные схемы компенсации последовательного сопротивления. В работах А. Ходжкина и А. Хаксли уровень компенсации  $R_{\Pi}$  составлял  $\sim 60\%$ . В настоящее время предложены активные мостовые схемы, позволяющие компенсировать  $R_{\Pi}$  полностью без ущерба для стабильной работы системы фиксации потенциала.

## § 7. Применение метода фиксации напряжения

**Идентификация переносимого иона.** Для успешного исследования ионной проницаемости мембран методом фиксации потенциала необходимо прежде всего выделить из суммарной кинетической кривой ионного тока отдельные компоненты, обусловленные функционированием разных ионных каналов. В качестве инструмента для селективного подавления отдельных компонентов ионного тока используют блокаторы, а также замещение проникающих ионов на непроникающие. В ряде случаев для разделения активности  $\text{Na}^+$  и  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов удается использовать различия потенциалозависимости их активации. Так, предварительная деполаризация тратекул пред-



сердца лягушки на 35—40 мВ от уровня потенциала покоя переводит  $\text{Na}^+$ -каналы сначала в активированное, а затем в полностью инактивированное состояние, но оказывается недостаточной для активации  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов; последующая дополнительная ступень деполяризации активирует входящий ток, который проходит только через  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы.

Природу иона, ответственного за возникновение тех или иных компонентов ионного тока, определяют обычно по потенциалу реверсии. Например, быстрый входящий ток в аксоне кальмара изменяет направление при напряжении, совпадающем с равновесным нернстовским потенциалом для  $\text{Na}^+$ . Изменение концентрации  $\text{Na}^+$  в среде приводит к сдвигу потенциала реверсии быстрого входящего тока в примерном соответствии с уравнением Нернста. Аналогичным образом были идентифицированы  $\text{Cl}^-$ -каналы в плазмалемме клеток харовых водорослей. Медленный компонент входящего тока в этих водорослях изменял знак при потенциале, близком к равновесному потенциалу ионов  $\text{Cl}^-$ . Десятикратное изменение активности  $\text{Cl}^-$  в среде смещало потенциал реверсии на 54 мВ в близком соответствии с уравнением Нернста, а изменение концентрации катионов не оказывало заметного влияния на потенциал реверсии данного компонента тока.

**Определение селективности.** Установив природу ионных каналов в исследуемом объекте, определяют их селективность. Для этого сравнивают потенциалы реверсии исследуемого компонента ионного тока в условиях, когда проникающие ионы последовательно заменяют во внешней или внутренней среде на эквивалентное количество других ионов того же знака и валентности. При этом используют уравнение для потенциала нулевого тока (уравнение Гольдмана — Ходжкина — Катца) — ток через каналы, пронизываемые для ионов одного знака и валентности, равен нулю при выполнении соотношения

$$E_0 = \frac{RT}{zF} \ln \frac{\sum P_j [c_o]_j}{\sum P_j [c_i]_j},$$

где  $E_0$  — потенциал нулевого тока (потенциал реверсии);  $P_j$  — проницаемость для ионов  $j$ ;  $[c_o]_j$  и  $[c_i]_j$  — концентрация этих ионов в наружной и внутренней среде соответственно.

При изменении состава среды концентрация ионов внутри клетки сохраняется некоторое время на прежнем уровне. Поэтому изменение  $[c_o]$  до нового значения  $[c_o]'$  приводит к смещению потенциала реверсии на величину

$$\Delta E_0 = \frac{RT}{zF} \ln \frac{\sum P_j [c_o]'_j}{\sum P_j [c_o]_j}.$$

Для оценки селективности каналов удобно подобрать среду так, чтобы она содержала только один вид проникающих ионов. Тогда при замещении в среде ионов  $A$  на ионы  $B$  в той же концентрации сдвиг потенциала реверсии составит

$$\Delta E_0 = \{RT/(zF)\} \ln(P_B/P_A).$$

Таким способом определяют относительную проницаемость ионных каналов для одновалентных катионов.

Соотношение для сдвига потенциала реверсии можно вывести и на основе модели ионного канала с трехбарьерным профилем потенциальной энергии. При описании транспорта ионов в рамках теории скоростей реакций проницаемость определяют произведением константы скорости преодоления основного энергетического барьера  $v_j$  на константу равновесия, характеризующую взаимодействие иона с участками связывания в ионном канале  $\gamma_j$ :

$$P_j = v_j \gamma_j.$$

Метод определения селективности по сдвигу потенциала реверсии неприменим для  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов и других систем, для которых не удастся измерить потенциал реверсии ионного тока. В этих случаях селективность оценивают по максимальным значениям тока в растворах с эквимоллярным замещением проникающего иона. В момент максимальной активации проводимости трансмембранный ток создается движением ионов по градиенту электрохимического потенциала, а встречный поток пренебрежимо мал. Поэтому максимальный входящий ток в приближении постоянного поля равен

$$I_{\max} = zF\beta P_j V c_o (1 - \exp \beta V)^{-1}, \quad (\text{IV.7.1})$$

где  $V$  — фиксируемый потенциал,  $\beta = zF/(RT)$ . Отношение максимальных значений тока, измеренных до и после эквимоллярного замещения проникающего иона ( $A$ ) другим видом ионов ( $B$ ), равно отношению проницаемостей:

$$I_{\max}^A / I_{\max}^B = P_A / P_B. \quad (\text{IV.7.2})$$

Линейная зависимость максимального тока от концентрации проникающего иона, предсказываемая уравнением (IV.7.1), соблюдается лишь при низких концентрациях. Это связано с тем, что уравнения постоянного поля применимы к транспорту в ионных каналах только при соблюдении принципа независимости ионных потоков, т. е. в условиях, когда вероятность заполнения ион-связывающего участка в канале мала.

На рис. 68 схематично показана зависимость проводимости ионного канала от концентрации для двух различных видов ионов. Видно, что при низких концентрациях отношение проводимостей канала для двух видов ионов равно отношению их проницаемостей, однако это равенство нарушается при переходе к концентрационному насыщению проводимости. Таким образом, при определении

селективности по амплитудам ионных токов необходимо учитывать осложнения, связанные с нелинейными зависимостями проводимости каналов от концентрации проникающих ионов.

На основе теории однорядного транспорта ионов для случая низких концентраций можно получить выражение, аналогичное (IV. 7.2):

$$I_{\max}^A / I_{\max}^B = \gamma_A \nu_A / (\gamma_B \nu_B),$$

где  $\gamma$  — константа связывания иона в канале,  $\nu$  — константа скорости преодоления основного энергетического барьера.

Между проницаемостью  $P = \gamma \nu$  и связыванием иона в канале  $\gamma$  нет однозначного соответствия. В примере, приведенном на рис. 68, хорошо проникающие ионы  $A$  сильнее связываются в канале, чем плохо проникающие ионы  $B$ .

Равновесная константа связывания  $\gamma$  численно равна обратной концентрации проникающего иона, при которой проводимость (максимальный ток) составляет половину предельного значения:  $\gamma = 1/c_*$ . Совсем иная связь между проницаемостью и константой связывания установлена для  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов нервных клеток. Через  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы лучше всего проходят ионы, слабо связываемые в канале. Двухвалентные катионы с высоким связыванием плохо проникают и действуют как блокаторы.

Данные о ионной селективности наряду с концентрационными несут информацию о профиле потенциальной энергии различных ионов в исследуемых каналах.

**Мгновенная вольт-амперная характеристика.** Обычная форма записи для натриевого и других токов  $I_j = g_j (V - E_j)$  отражает представление о том, что изменения тока  $I_j$  в условиях фиксации напряжения обусловлены изменением во времени проводимости  $g_j$ . Как следует из приведенного уравнения, ток должен линейно зависеть от мембранного потенциала  $V$  при условии, что за очень короткое время измерений проводимость не успевает измениться заметным образом. Иными словами, вольт-амперная характеристика, измеренная в любой момент времени в период развития ионного тока, должна быть *линейной*.

Метод построения мгновенных вольт-амперных характеристик состоит в том, что на мембрану подают два импульса: первый — кондиционирующий и второй — тестирующий. Первая деполяризующая ступень потенциала вызывает развитие ионного тока. На пике или в нисходящей фазе ионного тока мембранный потенциал скачком переключают на новый уровень (рис. 69). При этом

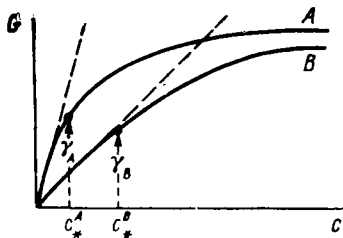


Рис. 68. Зависимости проводимости ( $G$ ) ионных каналов от концентрации двух проникающих ионов ( $A$  и  $B$ )

Пунктиром показан наклон линейного участка кривой; стрелками отмечены точки на кривых, используемые для расчета константы связывания проникающего иона со связывающей группировкой канала ( $\gamma = c^{-1}$ )

обычно наблюдают мгновенные смещения тока, пропорциональные сдвигу мембранного потенциала. Линейность построенных таким способом мгновенных характеристик, с одной стороны, подтверждает гипотезу Ходжкина — Хаксли, с другой — указывает на отсутствие аппаратных артефактов (нелинейный режим работы измерительных устройств, несоответствие входного сигнала динамическому диапазону усилителя и др.).

Угол наклона мгновенной вольт-амперной характеристики определяется числом открытых каналов в момент измерения. Если кондиционирующий импульс приводит к открыванию всех имеющихся в мембране  $\text{Na}^+$ -каналов, а инактивация к моменту измерения не успевает развиться, то угол наклона мгновенной вольт-амперной характеристики совпадает с наклоном восходящей ветви пикового  $\text{Na}^+$ -тока (рис. 70).

При больших отрицательных потенциалах мгновенная вольт-амперная характеристика  $\text{Na}^+$ -каналов в аксоне кальмара и других объектах отклоняется от линейной зависимости. Отклонение объясняют потенциалзависимой блокировкой  $\text{Na}^+$ -каналов  $\text{Ca}^{2+}$ .

**Зависимость числа открытых каналов от потенциала.** Поскольку линейный участок мгновенной вольт-амперной кривой простирается достаточно далеко (рис. 70), можно с достаточной точностью считать, что проводимость открытых каналов не зависит от потенциала. Тогда пиковое значение  $\text{Na}^+$ -проводимости ( $g_{\text{Na}}^{\text{п}}$ ) пропорционально числу открытых каналов. Зависимость  $g_{\text{Na}}^{\text{п}}$  от мембранного потенциала находят из вольт-амперной характеристики пикового  $\text{Na}^+$ -тока по формуле  $g_{\text{Na}}^{\text{п}} = I_{\text{Na}}^{\text{п}} / (V - E_{\text{Na}})$ . Эта зависимость имеет S-образную форму с насыщением в потенциалах, соответствующую

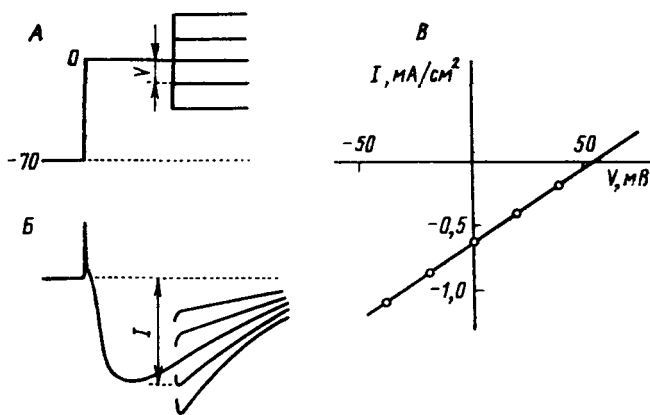


Рис. 69. Построение мгновенных вольт-амперных характеристик  $\text{Na}^+$ -каналов. А — режим изменения напряжения на мембране; Б — изменения  $\text{Na}^+$ -тока; В — мгновенная вольт-амперная характеристика

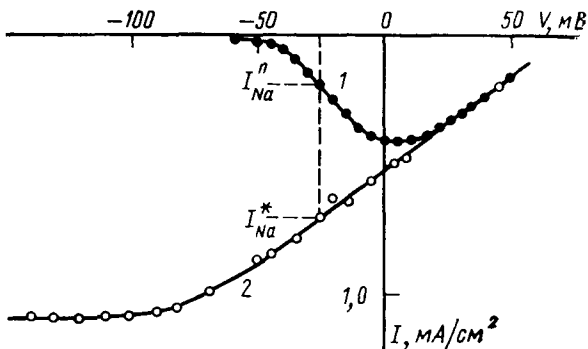


Рис. 70. Вольт-амперная характеристика, построенная по пиковым значениям  $\text{Na}^+$ -тока ( $I$ ), и мгновенная вольт-амперная характеристика (2):

$I_{\text{Na}}^n$  и  $I_{\text{Na}}^*$  — пиковое и мгновенное значения  $\text{Na}^+$ -тока для одного из значений мембранного потенциала; для измерения мгновенных значений тока аксон предварительно деполяризовали до +50 мВ, а затем смещали потенциал на заданный уровень

щих восходящей ветви пиковой вольт-амперной характеристики (рис. 71). Проводимость  $g_{\text{Na}}^n$  определяется углом наклона прямой, проведенной из потенциала реверсии до пересечения с вольт-амперной кривой при данном потенциале. После введения нормировочного множителя зависимость  $g_{\text{Na}}^n(V)$  отражает долю открытых каналов при различных значениях мембранного потенциала.

Существует второй способ определения зависимости числа открытых каналов от напряжения. Показателем числа открываемых каналов служит отношение пикового  $\text{Na}^+$ -тока (см. рис. 70, 1) к максимально возможному при данном потенциале значению  $\text{Na}^+$ -тока, протекающего при активации всех  $\text{Na}^+$ -каналов исследуемого участка мембраны (см. рис. 70, 2). Как видно из рисунка, соотношение пикового и мгновенного значений  $\text{Na}^+$ -тока очень мало при больших отрицательных потенциалах и стремится к единице с увеличением напряжения в области положительных значений. Зависимости доли открытых каналов от напряжения, полученные двумя рассмотренными методами, обычно мало отличаются,

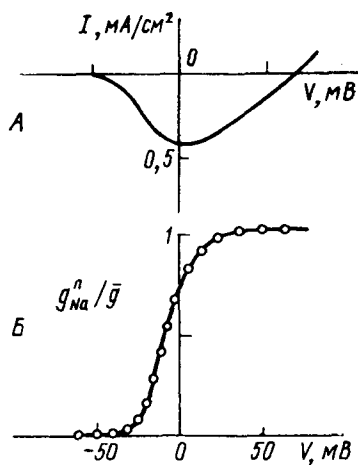


Рис. 71. Вольт-амперная характеристика пиковых значений тока (А) и зависимость пиковой проводимости ( $g_{\text{Na}}^n/\bar{g}$ ) от потенциала (Б)

За единицу принято максимальное значение проводимости ( $g$ )

однако второй метод более точен, так как применим и в области загиба мгновенной вольт-амперной характеристики.

При оценке числа открытых каналов по пиковым значениям  $\text{Na}^+$ -тока исходят из предположения, что в пике  $\text{Na}^+$ -тока инактивация пренебрежимо мала. Однако пренебрежение инактивацией вносит ошибку в расчеты и приводит к некоторому искажению зависимостей доли открытых каналов от напряжения. В опытах с аксонами кальмара точность построений удавалось существенно повысить, подавив инактивацию проназой и воспользовавшись вместо пиковых значений стационарными значениями  $\text{Na}^+$ -тока.

**Стационарный уровень активации.** Построив зависимость доли открытых каналов  $F$  от напряжения, легко отыскать зависимость стационарного уровня активации  $m_\infty$  от напряжения. Действительно, доля открытых  $\text{Na}^+$ -каналов определяется отношением пиковой  $\text{Na}^+$ -проводимости при данном потенциале  $g_{\text{Na}}^n$  к максимальной  $\text{Na}^+$ -проводимости  $\bar{g}_{\text{Na}}$ , которое в рамках модели Ходжкина — Хаксли равно произведению  $m^3 h$ :

$$F = g_{\text{Na}}^n / \bar{g}_{\text{Na}} = m^3 h.$$

Предполагая, что в пике  $\text{Na}^+$ -тока  $m = m_\infty$ , а  $h \approx 1$ , получают

$$m_\infty = (g_{\text{Na}}^n / \bar{g}_{\text{Na}})^{1/3} = (I_{\text{Na}}^n / I_{\text{Na}}^*)^{1/3},$$

где  $I_{\text{Na}}^n / I_{\text{Na}}^*$  — отношение пикового и мгновенного значений  $\text{Na}^+$ -тока (см. рис. 70). Зависимость  $m_\infty^3$  от мембранного потенциала совпадает с нормированной зависимостью пиковой проводимости от потенциала лишь в тех случаях, когда инактивация развивается намного медленнее по сравнению с активацией ( $\tau_h \gg \tau_m$ ) или отсутствует вовсе.

В тех случаях, когда значения  $\tau_m$  сравнимы по величине с  $\tau_h$ , для определения  $m_\infty$  экстраполируют задний фронт  $\text{Na}^+$ -тока к моменту подачи тестирующего импульса. Вычисления проводят так же, как описано выше, подставляя вместо  $I_{\text{Na}}^n$  экстраполированные значения. Зависимость стационарного уровня активации  $m_\infty$  от мембранного потенциала приведена на рис. 64.

**Постоянная времени активации.** Постоянную времени активации  $\text{Na}^+$ -проводимости определяют по переднему фронту  $\text{Na}^+$ -тока. Кинетика  $\text{Na}^+$ -тока в модели Ходжкина — Хаксли описывается уравнением

$$I_{\text{Na}} = \bar{g}_{\text{Na}} m^3 h (V - E_{\text{Na}}).$$

При большой деполяризации мембраны после предварительной гиперполяризации переменная  $m$  возрастает экспоненциально от нуля до единицы с постоянной времени  $\tau_m$ , а переменная  $h$  экспоненциально убывает с постоянной времени  $\tau_h$ . Следовательно,

$$I_{\text{Na}} = \bar{g}_{\text{Na}} (1 - e^{-t/\tau_m})^3 e^{-t/\tau_h} (V - E_{\text{Na}}). \quad (\text{IV.7.3})$$

Для того чтобы определить  $\tau_m$  с учетом влияния инактивации на кинетику развития  $\text{Na}^+$ -тока, используют следующий прием. Выбирают произвольные моменты времени  $t$  и  $T$ , соответствующие нарастанию и инактивации  $\text{Na}^+$ -тока. Отношение  $\text{Na}^+$ -токов для этих моментов времени равно

$$\frac{I_t}{I_T} = \frac{(1 - e^{-t/\tau_m})^3 e^{-t/\tau_h}}{(1 - e^{-T/\tau_m})^3 e^{-T/\tau_h}}$$

Для  $T \gg \tau_m$  получается

$$-t/\tau_m = \ln \left[ 1 - \left( \frac{I_t}{I_T} e^{\frac{T-t}{\tau_h}} \right)^{1/3} \right].$$

При построении графика зависимости правой части уравнения от времени  $t$  получается прямая линия с угловым коэффициентом  $-\frac{1}{\tau_m}$ . Таким способом находят  $\tau_m$  для данного фиксированного потенциала. Аналогичные измерения при других значениях потенциалов позволяют построить зависимость  $\tau_m$  от напряжения. Пример такой зависимости приведен на рис. 65.

Другой способ оценки  $\tau_m$  основан на измерении времени от момента подачи деполяризующего импульса до максимума  $\text{Na}^+$ -тока. Этот метод применяют в тех случаях, когда  $\text{Na}^+$ -ток имеет выходящее направление и фронт нарастания тока маскируется переходным процессом зарядки мембранной емкости. Натриевый ток описывается уравнением [см. (IV.7.3)]

$$I_{\text{Na}} = I_n (1 - e^{-t/\tau_m})^3 e^{-t/\tau_h}.$$

Пиковому значению  $\text{Na}^+$ -тока ( $I_n$ ) соответствует условие  $dI_{\text{Na}}/dt = 0$ , и так как  $\tau_h \gg \tau_m$ , то

$$t_n = \tau_m \ln(3\tau_h/\tau_m).$$

**Инактивация натриевой проводимости.** Постоянную времени инактивации  $\text{Na}^+$ -тока определяют по заднему фронту кинетической кривой. В аксоне кальмара спад  $\text{Na}^+$ -тока описывается одной экспонентой с постоянной времени  $\tau_h$ . При изображении в полулогарифмическом масштабе кривая спада  $\text{Na}^+$ -тока спрямляется и по углу наклона полученной прямой определяют  $\tau_h$ . При действии некоторых токсинов, а также на ряде объектов в обычных условиях кинетика инактивации описывается суммой двух экспонент.

Для измерения кинетики  $h(t)$  и определения  $\tau_h$  используют также двухимпульсный метод, предложенный А. Ходжкиным и А. Хаксли. Мембрану подвергают сначала воздействию кондиционирующего импульса, длительность которого может меняться, а амплитуда постоянна. Этот импульс вызывает развитие инактивации. Поэтому, если вслед за первым импульсом подать через короткое время ( $\sim 1$  мс) второй, тестирующий, импульс, пиковое значение тока в от-

вет на второй импульс окажется пониженным по сравнению с ответом на такой же импульс без предварительной деполяризации. Ослабление  $\text{Na}^+$ -тока отражает уменьшение доли  $\text{Na}^+$ -каналов, способных к активации в ответ на тестирующий импульс. Таким образом, кинетику развития инактивации прослеживают по спаду амплитуды  $\text{Na}^+$ -тока, развивающегося в ответ на второй импульс при увеличении длительности предварительной деполяризации мембраны.

Двухимпульсный метод используют также для определения стационарного уровня инактивации  $h_\infty$  и построения зависимости  $h_\infty$  от напряжения. Величину  $h_\infty$  для различных значений мембранного потенциала определяют как долю  $\text{Na}^+$ -каналов, способных к активации в ответ на тестовую деполяризацию до + (50—80) мВ после длительного (порядка 100 мс) предварительного смещения потенциала на заданный уровень. Большая длительность кондиционирующего смещения мембранного потенциала необходима для того, чтобы успевало установиться стационарное значение  $h$ . За единицу принимают уровень  $h_\infty$ , создаваемый предварительной гиперполяризацией мембраны до потенциалов — (80—140) мВ. Это связано с тем, что гиперполяризующие смещения потенциала не приводят к развитию инактивации. Типичные зависимости  $h_\infty$  и  $\tau_h$  от потенциала приведены на рис. 64, 65.

**Выход из инактивации.** Динамику выхода ионных каналов из инактивации (реактивация) исследуют двухимпульсным методом. Первый импульс постоянной величины и длительности подобран так, чтобы вызвать полную инактивацию  $\text{Na}^+$ -проводимости. Если второй импульс приходит мгновенно за первым,  $\text{Na}^+$ -ток не развивается. Однако при увеличении промежутка времени между импульсами происходит ослабление инактивации и амплитуда  $\text{Na}^+$ -тока в ответ на второй (тестирующий импульс) возрастает. Скорость выхода из инактивации существенно зависит от уровня потенциала в период между импульсами: при высоких отрицательных потенциалах выход из инактивации происходит быстрее, чем при более положительных значениях мембранного потенциала.

**Определение заряда воротных частиц.** По зависимости пиковой хордовой проводимости  $g_{\text{Na}}^n$  от потенциала (рис. 72) можно оценить эффективную валентность воротных частиц. В модели, рассматривающей перескоки заряженных  $m$ -частиц через гидрофобную зону мембраны под действием тепловых флуктуаций и электрического поля, стационарное распределение  $m$ -частиц между наружной и внутренней границами мембраны определяется уравнением Больцмана

$$(1 - m_\infty)/m_\infty = \exp[-zFV/(RT)].$$

Отсюда

$$m_\infty = \frac{1}{1 + \exp\left(\frac{-zFV}{RT}\right)}.$$



Уравнение предсказывает в соответствии с экспериментом S-образное возрастание  $m_\infty$  от нуля до единицы при повышении  $V$ . Реальная зависимость  $m_\infty(V)$  сдвинута в сторону отрицательных напряжений. Сдвиг кривой  $m_\infty(V)$  по шкале потенциалов учитывается уравнением

$$m_\infty = \left[ 1 + e^{\frac{-zF}{RT}(V - V_*)} \right]^{-1},$$

где  $V_*$  — потенциал половинного изменения  $m_\infty$ . Участок кривой, где  $m_\infty \ll 1$  аппроксимируется экспонентой

$$m_\infty = \exp \left[ \frac{zF}{RT}(V - V_*) \right].$$

Считая, что нормированная пиковая проводимость  $g_{Na}^n$  пропорциональна  $m_\infty^3$ , получают

$$\ln g_{Na}^n = \left[ \frac{3zF}{RT} \right] (V - V_*).$$

Зависимость  $g_{Na}^n$  от потенциала, представленная в полулогарифмических координатах, имеет линейный участок, наклон которого пропорционален эффективной валентности  $z$  воротных  $m$ -частиц (рис. 72). По изменению угла наклона линейного участка этой зависимости выявляют изменения свойств воротной системы  $Na^+$ -каналов при их модификации химическими агентами. Например, обработка нервных волокон водорастворимыми карбодимидами при низких значениях pH приводит к уменьшению эффективного заряда воротных частиц  $Na^+$ -каналов на 40%. Используя полученную формулу, можно оценить суммарный заряд ( $3z$ ), переносимый воротными частицами в расчете на один канал. Например, изменение  $\ln g_{Na}^n$  на единицу при сдвиге мембранного потенциала  $V$  на 7 мВ свидетельствует о том, что для открывания  $Na^+$ -канала необходим перенос четырех элементарных зарядов.

## § 8. Ионные каналы в плоском липидном бислое

Техника фиксации мембранного потенциала на целых клетках и электрически изолированных участках клеток долгое время служила основным источником сведений об ионной проницаемости возбудимых мембран. Позднее появились новые методы, позволяющие регистрировать токи через одиночные ионные каналы и изучать механизмы управления ионными каналами и особенности прохождения ионов через открытый канал. Измерения крайне слабых токов (порядка 1 пА), протекающих через одиночные каналы, стали возможны благодаря разработке усовершенствованной регистрирующей аппаратуры с низким уровнем шумов и достаточным временным разрешением.

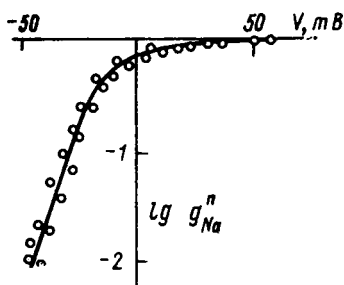


Рис. 72. Зависимость нормированной пиковой  $Na^+$ -проводимости (доля открытых каналов) аксона кальмара от мембранного потенциала в полулогарифмических координатах

Первые исследования одиночных ионных каналов были выполнены на фосфолипидных бимолекулярных мембранах, модифицированных крайне низкими концентрациями грамицидина, амфотерицина и некоторых других ионофоров. Обнаружение каналообразующих свойств у ионофоров, структура которых хорошо известна и допускает химическую модификацию, позволило начать изучение механизмов проницаемости на молекулярном уровне с целью выяснения общих принципов функционирования ионных каналов биологических мембран.

**Определение проводимости и емкости бимолекулярных липидных мембран.** Для определения электрических характеристик бимолекулярных липидных мембран (БЛМ) используют *метод фиксации напряжения*. Принципиальная схема измерений показана на рис. 73.

Мембрану формируют на отверстиях в тефлоновой перегородке, разделяющей два водных раствора KCl или других солей. В оба отсека измерительной ячейки погружают идентичные неполяризующиеся электроды сравнения с низким сопротивлением. Один из электродов подключен к выходу генератора электрических сигналов; второй электрод замкнут на землю через преобразователь ток — напряжение. Напряжение, задаваемое на выходе генератора, полностью падает на мембране, сопротивление которой намного выше сопротивления электродов, электролита и эффективного сопротивления измерителя тока. Сигнал с выхода преобразователя ток — напряжение регистрируют на осциллографе и самопишущем потенциометре. Установка позволяет измерять ток через мембрану при фиксированных значениях трансмембранной разности потенциалов, а также при наложении импульсов напряжения произвольной формы.

Для формирования БЛМ используют растворы общих липидов мозга животных в тетрадекане или других жидких углеводородах с длиной углеродной цепи от 6 до 16 атомов (октан, декан, додекан). Широко используют также растворы азолектина (фосфолипиды соевых бобов), индивидуальные фосфолипиды, экстракты липидов из различных тканей, клеток и органелл. В мембранный раствор добавляют иногда токоферол, повышающий стабильность мембран.

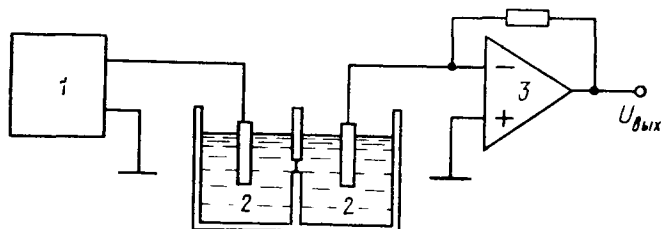


Рис. 73. Измерение электрических параметров бимолекулярной фосфолипидной мембраны:

1 — генератор импульсов и источник постоянных напряжений, 2 — неполяризующиеся электроды, 3 — преобразователь ток — напряжение

или холестерин, необходимый для формирования ионных каналов в присутствии амфотерицина.

При нанесении раствора фосфолипидов на отверстие в тефлоновой перегородке происходит спонтанное вытеснение растворителя к краям отверстия и утоньшение БЛМ. По мере растекания фосфолипидного слоя в поле зрения микроскопа появляются и ширятся черные островки, свидетельствующие о том, что толщина мембраны стала намного меньше длины волны света, при котором происходит наблюдение. БЛМ ограничена по периферии тором растворителя, вмещающим избыточное количество липидов.

Увеличение площади липидного бислоя сопровождается увеличением электрической емкости мембраны. Поэтому образование БЛМ удобно наблюдать по увеличению емкостного тока, протекающего через мембрану при наложении на нее треугольных импульсов напряжения. Ток в цепи складывается из омической и емкостной составляющих:

$$I = I_R + I_C = V/R_M + C_M dV/dt.$$

При высокой скорости нарастания потенциала ток через сопротивление немодифицированной мембраны  $R_M$  пренебрежимо мал по сравнению с емкостным током, т. е.  $I = C_M dV/dt$ . Форма подаваемых на мембрану импульсов напряжения и протекающего через мембрану тока для случая, когда  $I_C \gg I_R$ , представлена на рис. 74. Значение емкости рассчитывают по формуле  $C_M = I/(dV/dt)$ , где  $I$  — емкостный ток, а  $dV/dt$  — скорость изменения потенциала на мембране. Как видно из рис. 74,  $dV/dt = 4Af$ , где  $A$  — амплитуда изменений напряжения на выходе генератора,  $f$  — частота колебаний, Гц.

Периодические прямоугольные колебания емкостного тока можно подать на выпрямитель и получить на выходе постоянный или медленно меняющийся сигнал, пропорциональный емкости мембраны. Увеличение емкости в процессе формирования БЛМ в таком случае непосредственно регистрируют на самопишущем приборе. Скорость формирования липидного бислоя зависит от температуры, рН среды, состава мембранного раствора и других факторов.

Немодифицированные БЛМ обладают проводимостью  $1-10$  нСм/см<sup>2</sup> и емкостью  $0,3-0,9$  мкФ/см<sup>2</sup>. Наибольшая емкость присутствует в мембранах, в составе которых отсутствует растворитель. Такие

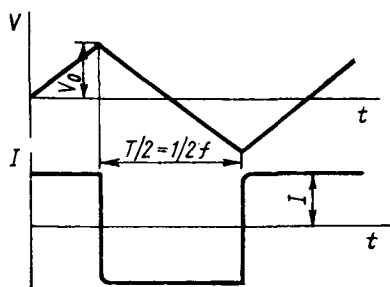


Рис. 74. Измерение емкостного тока при наложении на мембрану треугольных импульсов напряжения:

$V_0$  — амплитудное напряжение,  $T$  — период колебаний,  $t$  — время

мембраны можно получить, используя в качестве растворителя сквален, а также формируя БЛМ из двух монослоев по методу Монтала. Описанный простой метод определения емкости применим лишь в тех случаях, когда ток проводимости намного меньше емкостного тока, т. е. в опытах с немодифицированными мембранами.

При добавлении ионофоров в сравнительно больших концентрациях проводимость БЛМ возрастает на несколько порядков. При измерениях в режиме фиксации напряжения это проявляется в резком увеличении трансмембранного тока. Аналогичным образом можно регистрировать изменения проводимости мембран при других воздействиях, например при освещении БЛМ, содержащих бактериородопсин или экстракты фотосинтетических пигментов.

**Ионные каналы, образуемые антибиотиками.** Ионофоры, повышающие проводимость БЛМ, по механизму действия делятся на две группы. К первой относятся *валиномицин* и другие *нейтральные макроциклические антибиотики*, способные связывать ионы щелочных металлов с образованием липофильных положительно заряженных комплексов. Благодаря высокой липофильности свободных комплексов и заряженных комплексов валиномицин и его аналоги служат эффективными переносчиками ионов через БЛМ.

Ко второй группе относятся *грамцидины*, *аламетицин* и *полиеновые антибиотики*, образующие в БЛМ ионные каналы. При внесении этих антибиотиков в водные растворы с обеих сторон БЛМ в крайне низких концентрациях (порядка 1 пМ для грамицидина А) выявляются дискретные флуктуации тока, амплитуда которых значительно превышает значение фонового тока через немодифицированные мембраны. Фоновая проводимость БЛМ малого диаметра (50—200 мкм) не превышает нескольких пикосименс, а скачки тока, индуцируемые грамицидином А, соответствуют проводимости около 30 пСм. Дискретные флуктуации тока примерно равны по величине и составляют несколько пикоампер при напряжении на мембране 50—100 мВ.

Возникновение дискретных скачков проводимости в присутствии ионофоров принято объяснять образованием сквозного трансмембранного канала из двух или нескольких субъединиц. Например, молекулы грамицидина А, попадая в мембрану, свертываются в *полупору* — спиральную структуру размером около 3 нм. Полупоры ориентируются перпендикулярно плоскости мембраны, удерживаясь полярным концом на границе с водным раствором. Спиральная конфигурация молекулы имеет внутреннюю полость, в которую обращены полярные группы. Проводящее состояние возникает при случайном образовании сквозной димерной структуры, стабилизированной межмолекулярными водородными связями. Обратный скачок проводимости объясняют распадом димера вследствие дестабилизирующего влияния тепловых колебаний. Дискретные скачки проводимости могут быть также вызваны локальными измене-

ниями толщины БЛМ, поворотом димера в мембране и другими причинами.

По гистограмме амплитудных значений дискретных флуктуаций тока рассчитывают среднюю проводимость одиночного ионного канала, а распределение времен проводящего и непроводящего состояний дает информацию о среднем времени жизни канала и константах скоростей образования и разрушения проводящих структур. Проводимость ионного канала рассчитывают по формуле  $g = I/V$ , где  $I$  — среднее значение дискретных скачков тока,  $V$  — разность потенциалов на мембране. Проводимость канала зависит от концентрации солей в среде, поэтому, приводя значения проводимости, указывают состав окружающих растворов.

Скачки тока через одиночный канал с проводимостью 30 пСм при напряжении на мембране 50 мВ составляют 1,5 пА. Поскольку элементарный заряд равен  $1,6 \cdot 10^{-19}$  Кл, пропускная способность ионного канала составляет около  $10^7$  ионов/с.

Для оценки среднего времени жизни канала строят гистограммы распределения времен открытого состояния. При этом по оси абсцисс откладывают время, а по оси ординат — число открытых состояний, время жизни которых превышает заданное значение. В простейших случаях, когда ионный канал может находиться лишь в двух состояниях: открытом и закрытом, причем вероятность образования канала мала и не зависит от существования в мембране других каналов, гистограмма распределения представляет собой экспоненту, характерное время которой равно среднему времени открытого состояния.

Успешное изучение ионных каналов, образуемых пептидными антибиотиками, определило многочисленные попытки реконструкции ионных каналов биологических мембран в липидном бислое. Наблюдение одиночных каналов дает значительно большую информацию, чем исследование мембран с большим числом каналов. При наблюдении индивидуальных каналов устраняется основная трудность обычных измерений, состоящая в том, что ионные токи в целых клетках обусловлены совместным функционированием нескольких типов проводящих структур. Кроме того, измерения токов одиночных каналов дают прямую информацию о проводимости и времени открытого состояния канала, а также о влиянии потенциала и химических агентов на эти параметры.

**Реконструкция ионных каналов в БЛМ.** Реконструкция ионных каналов в БЛМ должна включать три основных этапа: экстракцию каналов из нативных мембран с помощью детергентов или растворителей, последующую очистку выделенных белков и встраивание их в липидный бислой. Реконструированные системы открывают возможность исследовать работу одиночных ионных каналов при различных модификациях липидного состава мембран.

В плоские БЛМ удалось встроить  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы, присутствующие в гомогенате клеток харовых водоростей. Показано, что дискрет-

ные скачки проводимости модифицированных БЛМ, омываемых 0,1 М раствором КСl, составляют 200 пСм. Основные характеристики  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов, встроенных в БЛМ (селективность, управление полем), обнаруживали хорошее соответствие результатам измерений  $\text{Ca}^{2+}$ -токов в мембране целых водорослей. Однако реконструкция ионных каналов в плоских БЛМ оказалась в целом трудной задачей и не получила широкого применения.

Альтернативный подход состоит в том, чтобы вначале встроить в липосомы мембранные белки, а затем осуществить слияние липосом с плоской БЛМ. Из мелких липосом с помощью особых приемов можно получить крупные, диаметром до 50 мкм, пригодные для электрических измерений методом микроотведения. Например, были получены крупные протеолипосомы, содержащие каналы ацетилхолинового рецептора и  $\text{Cl}^-$ -каналы мембран электрического органа угря. Для получения протеолипосом сначала солибилизировали нативные мембранные белки в растворе детергента в присутствии липидов, а затем удаляли детергент диализом. При этом получали мелкие липосомы, диаметром 0,5—2 мкм, содержащие встроенные белки. После многократного замораживания липосом в жидком азоте и размораживания на льду при комнатной температуре получали крупные липосомы с диаметром 30—50 мкм, оказавшиеся удобным объектом для регистрации токов одиночных ионных каналов с помощью микроприсосок.

Еще один подход к изучению ионных каналов в реконструированной системе состоит в формировании модифицированного липидного бислоя на торце стеклянной микропипетки. В этом случае микропипетку заполняют раствором, содержащим каналообразующие белки или очищенные мембранные фракции, а затем перемещают микропипетку через границу раздела воздух — липид. При этом на торце пипетки иногда образуется БЛМ, содержащая отдельные ионные каналы.

## § 9. Измерение токов ионных каналов методом микроотведения

В последние годы разработан метод изучения ионных каналов биологических мембран, который состоит в измерении токов через микроскопически малые участки клеточной поверхности. Такие измерения стали возможны благодаря обнаруженной способности клеточных мембран плотно прилипать к кончику стеклянной микропипетки. Электрическое сопротивление контакта, образованного между поверхностью стекла в торце микропипетки и клеточной мембраной, превышает 10 ГОм. Благодаря гигаомному контакту обеспечивается хорошая электрическая изоляция участка мембраны, ограниченного торцом микропипетки. На площади порядка 1  $\text{мкм}^2$ , ограниченной периметром микроприсоски, располагается от единиц до нескольких десятков ионных каналов. В определенных условиях, когда вероятность нахождения каналов в открытом

состоянии мала, возможна регистрация токов одиночных ионных каналов.

Участок мембраны, фиксируемый в торце микропипетки, называют *мембранным пэтчем* (транслитерация от англ. *patch*). Исследуемый участок мембраны в ходе измерений может оставаться прикрепленным к целой клетке или быть отделен от нее. Таким образом, в эксперименте воспроизводят условия, близкие к нативным, а также обеспечивают контролируемый ионный состав растворов с обеих сторон мембраны. Изолированный мембранный фрагмент может сохраняться на торце присасывающей пипетки в течение нескольких часов после отделения от клетки.

Независимо от способа измерений (с прикрепленной клеткой или без нее) через микроучасток мембраны течет ток  $I_m$ , который суммируется с током утечки  $I_y$ , текущим в обход мембраны. Следовательно, возможность разрешения ионных токов отдельных каналов зависит в первую очередь от качества электрической изоляции микроучастка мембраны. В оптимальных условиях сопротивление утечки крайне велико ( $\geq 10$  ГОм), а уровень флуктуаций тока утечки настолько мал, что обнаруживается движение через мембрану нескольких сотен элементарных зарядов.

**Техника измерений.** Для измерения слабых токов используют преобразователь ток — напряжение (рис. 75).

Так как разность потенциалов между двумя входами операционного усилителя пренебрежимо мала, потенциал внутреннего объема микропипетки в точности равен командному напряжению  $E$ . При измерениях в варианте с прикрепленной клеткой на микроучастке мембраны поддерживается постоянное напряжение, равное разности между потенциалом цитоплазмы (потенциал покоя) и потенциалом пипетки. Таким образом обеспечивается локальная фиксация напряжения на мембране и регистрируются токи, протекающие через пипетку.

Поскольку ток утечки пропорционален приложенному командному напряжению, этот ток может быть автоматически вычтен из суммарного тока пипетки с помощью дополнительного усилителя. На один из входов дифференциального усилителя подают напряжение, пропорциональное суммарному току пипетки, на другой — некоторую часть командного напряжения. Подбирая масштаб командного сигнала, подаваемого на один из входов дифференциального усилителя, можно добиться полного устранения тока утечки в выходном сигнале.

**Временное разрешение метода.** Чувствительность измерений тока преобразователем ток — напряжение повышается с увеличением сопротивления  $R_f$  в цепи обратной связи (рис. 75). Для регистрации токов одиночных кана-

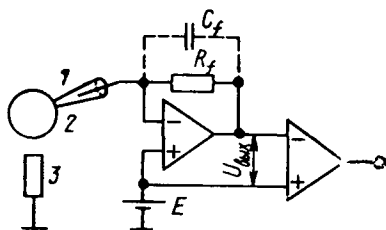


Рис. 75. Принципиальная схема локальной регистрации тока через микроучасток клеточной мембраны (метод пэтч-клампа):

1 — измерительная микропипетка с внутренним электродом сравнения, 2 — клетка, 3 — наружный электрод сравнения;  $R_f$  — резистор цепи обратной связи,  $C_f$  — паразитная емкость резистора обратной связи; преобразователь ток — напряжение дополнен схемой вычитания тока утечки

лов подходящее значение  $R_f$  составляет 10 ГОм. Промышленные резисторы с такими номинальными значениями имеют шунтирующую емкость не менее 0,1 пФ (конденсатор  $C_f$  на рис. 75), что ограничивает временное разрешение измеряемых токов. Напряжение на выходе операционного усилителя в режиме измерения тока равно  $U_{\text{вых}} = ZI$ , где  $I$  — ток во входной цепи,  $Z$  — импеданс цепи обратной связи. На низких частотах импеданс равен  $R_f$ , но на высоких он определяется главным образом шунтирующим сопротивлением емкости  $C_f$ .

Импеданс цепи обратной связи определяется уравнением  $1/Z = 1/R_f + i\omega C_f$ . Отсюда

$$Z = R_f / (1 + i\omega R_f C_f) = R_f / (1 + \tau_f S), \quad (IV.9.1)$$

где  $S = i\omega$ ,  $\tau_f = R_f C_f$  — постоянная времени цепи обратной связи, составляющая в типичном случае 1 мс. Импеданс, определяемый формулой (IV.9.1), показывает связь между выходным и входным сигналами и может быть представлен в виде произведения  $R_f$  на безразмерную передаточную функцию  $T(f)$ . Значение  $T(f)$  при низких частотах равно единице, но снижается с повышением частоты в области высоких частот. Зависимость  $T(f)$  совпадает с частотной характеристикой фильтра низких частот. Частота среза, при которой коэффициент передачи ослабляется вдвое, определяется условием  $\tau_f S = 1$ .

Реальная частотная характеристика преобразователя ток — напряжение отличается от идеальной наличием двух изломов, один из которых обусловлен паразитной емкостью резистора, а второй — в области более высоких частот — ограниченным быстродействием самого операционного усилителя. Для улучшения частотной характеристики преобразователя ток — напряжение подбирают резисторы обратной связи с минимальным значением шунтирующей емкости.

**Коррекция частотной характеристики.** Другой подход состоит в коррекции частотной зависимости. Рис. 76, А поясняет принцип коррекции.

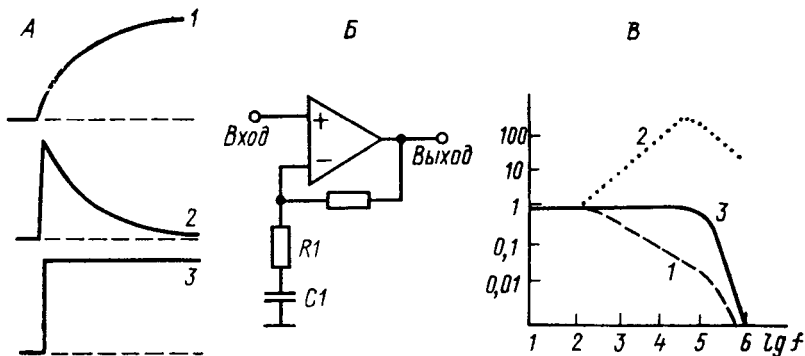


Рис. 76. Частотная коррекция выходного сигнала преобразователя ток — напряжение:

А — принцип коррекции; 1 — сигнал на входе корректирующей цепи; при суммировании его с подобранной по масштабу производной (2) восстанавливается исходная прямоугольная форма импульса (3);

Б — практическая схема коррекции;

В — частотная зависимость преобразователя ток — напряжение (1), схемы коррекции (2) и совмещенной схемы (3)



Кривая 1 изображает выходной сигнал преобразователя ток—напряжение при подаче на вход прямоугольной ступени тока. Выходное напряжение нарастает экспоненциально с постоянной времени  $\tau_f = R_f C_f$ , равной примерно 1 мс. Производная экспоненциальной функции также является экспонентой (кривая 2), поэтому, суммируя выходное напряжение с подобранной по масштабу производной выходного сигнала, можно восстановить истинную форму импульса.

Эту операцию осуществляет схема коррекции, показанная на рис. 76, Б. На низких частотах емкость  $C_1$  обеспечивает разрыв цепи и усилитель работает в режиме повторителя напряжения. С ростом частоты коэффициент усиления возрастает вследствие уменьшения импеданса емкости и увеличения падения напряжения на  $R_1$ . На рис. 76, В показаны частотные характеристики преобразователя ток—напряжение без цепи коррекции, отдельно взятой цепи коррекции и частотная зависимость преобразователя с подключенной цепью коррекции. Восстановление высокочастотной составляющей сигнала позволяет разрешить тонкую структуру переходов канала между открытым и закрытым состояниями.

Емкость в цепи обратной связи является распределенной, что вносит дополнительное искажение частотной характеристики преобразователя ток—напряжение.

**Уровень шумов.** Электрические шумы в преобразователе ток—напряжение определяются шумом сопротивления в цепи обратной связи и шумом полевого транзистора на входе усилителя. Влияние сопротивления  $R_f$  связано с тем, что ток, идущий через пипетку, протекает полностью через сопротивление  $R_f$ , не затекая на вход операционного усилителя. Тепловые флуктуации тока в резисторе обратной связи  $R_f$  создают фоновый шум в измерительной цепи.

Спектральная плотность теплового шума определяется формулой Найквиста  $S_f = 4kT \operatorname{Re} Y$ , где  $S_f$  — спектральное распределение шума тока, выражаемое в  $A^2/Гц$ ,  $k$  — постоянная Больцмана ( $\approx 1,38 \cdot 10^{-23}$  Дж/К),  $\operatorname{Re} Y$  — действительная часть адмиттанса. Адмиттансом называют комплексную проводимость, которая включает действительную и мнимую части:  $Y = \operatorname{Re} Y - \operatorname{Im} Y$  и представляет величину, обратную импедансу:  $Y = 1/Z$ . Для параллельного соединения  $R$  и  $C$  действительная часть комплексной проводимости равна  $1/R$ . Поэтому спектральная плотность флуктуаций тока в сопротивлении  $R_f$  равна  $S_f = 4kT/R_f$ . Интенсивность шума во входной цепи уменьшается с увеличением  $R_f$  и не зависит от частоты.

Уровень шумов на выходе регистрирующей системы зависит от частотной характеристики преобразователя ток—напряжение:

$$\sigma^2 = \int_0^{\infty} |T(f)|^2 S_f df,$$

где  $\sigma^2$  — дисперсия (средний квадрат) флуктуаций тока,  $T(f)$  — передаточная функция усилителя. Для практических целей можно считать, что  $T = 1$  в области частот от 0 Гц до частоты среза  $f_c$  и  $T = 0$  в области высоких частот начиная от частоты  $f_c$ . Следовательно, дисперсия флуктуаций тока равна произведению  $S_f$  на по-

лосу пропускания:  $\sigma^2 = f_c S_I$ . Среднеквадратичное отклонение равно  $\sigma = (4 kT f_c / R_f)^{1/2}$ .

Расчеты показывают, что при значениях  $R_f$  1 и 10 ГОм спектральная плотность флуктуаций тока составляет  $1,6 \cdot 10^{-29}$  и  $1,6 \times 10^{-30}$  А<sup>2</sup>/Гц, а среднеквадратичное отклонение — 0,13 и 0,04 пА при частоте среза 1 кГц.

Собственный шум усилителя определяется флуктуациями тока затвора в полевом транзисторе и по своей природе представляет дробовой шум, спектральная плотность которого не зависит от частоты:  $S_I = 2I_3 e$ , где  $e$  — элементарный заряд, равный примерно  $1,6 \cdot 10^{-19}$  Кл, а  $I_3$  — ток затвора. При  $I_3 = 5$  пА спектральная плотность дробового шума в полевом транзисторе составляет  $1,6 \cdot 10^{-30}$  А<sup>2</sup>/Гц, т. е. примерно равна шуму сопротивления  $R_f$  величиной 10 ГОм. Для уменьшения уровня шумов важно выбирать полевые транзисторы с минимальным током затвора.

Помимо рассмотренного аппаратного шума (шум  $R_f$  и шум полевого транзистора), важным источником шума является сопротивление микропипетки с прилегающей мембраной. Проводимость всей системы мембрана — утечка определяется в основном проводимостью утечки. В результате шум микропипетки с насаженной на торце мембраной определяется шумом сопротивления утечки, причем уровень флуктуаций тока тем выше, чем ниже сопротивление утечки. Проводимость утечки моделируют последовательной RC-цепью, для которой

$$\operatorname{Re} Y = \omega^2 RC^2 / (1 + \omega^2 R^2 C^2).$$

В тех случаях, когда сопротивление утечки составляет десятки мегаом, т. е. нет гигаомного контакта между пипеткой и мембраной, шум тока  $S_I$ , возникающий в микропипетке, становится основным компонентом шума тока в измерительной цепи.

Особенно велики флуктуации тока до приведения микропипетки в контакт с клеточной мембраной. Это связано с относительно низким сопротивлением микропипетки, которое в типичных случаях составляет 5 МОм. Кроме того, даже небольшая разность потенциалов, величиной в несколько милливольт между электродом в пипетке и наружным электродом сравнения, приводит к протеканию через микропипетку тока от долей наноампера до нескольких наноампер, который может переводить преобразователь ток — напряжение в насыщение или же создавать нестабильный выходной сигнал величиной в несколько вольт.

**Защита от перегрузок.** Одна из технических трудностей регистрации тока одиночных каналов состоит в необходимости защиты преобразователя ток — напряжение от перегрузок. Перегрузки возникают при переключениях командного напряжения. В этот момент происходит зарядка емкости микропипетки  $C_{вх}$ , которая составляет 2—10 пФ. Ток зарядки емкости достигает нескольких наноампер, что намного превышает уровень тока одиночных ионных каналов. Большие токи переводят усилитель в насыщение, причем иска-

жения тока сохраняются даже через несколько миллисекунд после завершения импульса.

При  $R_f = 10$  ГОм и максимальном выходном напряжении усилителя 10 В предельный ток составляет 1 нА. Во избежание перегрузок, возникающих на фронте прямоугольного командного импульса, в измерительную цепь вводят дополнительную цепь компенсации емкостного тока (рис. 77). В момент приложения командного напряжения в пипетку направляют ток через конденсатор  $C_i$ . Подстроен коэффициент усиления усилителя  $K_1$  так, чтобы выполнялось равенство  $(K_1 - 1) C_i = -C_{вх}$  (см. § 3 данной главы), можно исключить протекание емкостного тока во входной цепи.

**Свойства микропипеток.** Объектом исследования в методе микроотведения токов (*метод пэтч-клампа*) служит фрагмент клеточной мембраны, прикрепленный к торцу микропипетки. От геометрии и свойств пипеток зависят вероятность образования гигаомного контакта с мембраной, стабильность мембранного пэтча и значение тока утечки.

Пипетки готовят из легкоплавкого и тугоплавкого стекла. Пипетки из легкоплавких стекол с диаметром отверстия 1 мкм имеют сопротивление 1—5 МОм при заполнении их 150 мМ раствором KCl. Зависимость проводимости пипеток, заполненных этим раствором, от площади отверстия линейна с угловым коэффициентом 7 МОм·мкм<sup>2</sup>. Микропипетки из тугоплавкого стекла имеют некоторые преимущества, обусловленные высоким сопротивлением стенок капилляра и малой утечкой тока через стекло. Качество электрической изоляции можно дополнительно повысить за счет утолщения стенок микропипетки. При использовании толстостенных пипеток повышается стабильность и вероятность образования прочного контакта между стеклом и клеточной мембраной. Во избежание повреждения мембран и для удаления неровностей стекла кончики микропипеток оплавливают с помощью тонкой спирали. Сопротивление толстостенных пипеток, заполненных 150 мМ раствором KCl, составляют 8—11 МОм при площади отверстия около 1 мкм<sup>2</sup>.

**Геометрия пэтча.** На изолированных кардиомиоцитах и волокнах скелетных мышц адгезия мембраны к стеклу с образованием прочного гигаомного контакта происходит спонтанно при соприкосновении кончика пипетки с поверхностью клетки. Мембрана в этом случае не деформируется и площадь изолированного фрагмента примерно равна площади отверстия микроприсоски. Однако чаще высокоомный контакт образуется лишь после создания небольшого отрицательного давления в микропипетке. Возникновение прочного адгезионного контакта проявляется в резком увеличении сопротивления, а также в уменьшении флуктуаций тока. При касании торца микроприсоски к поверхности клетки сопровождается возрастанием сопротивления от 1—10 до 100—150 МОм, а создание внутри пипетки отрицательного давления величиной в 20—30 см вод. ст. приводит в течение нескольких секунд к дальнейшему возрастанию сопротивления до десятков гигаом. Под давлением мембрана втягивается все глубже в кончик микропипетки; при этом емкость и площадь свободной поверхности постепенно возрастают. Площадь свободной поверхности мембраны, втянутой в пипетку с диаметром кончика 1 мкм, составляет около 5 мкм<sup>2</sup>.

Поверхности стекла и мембраны сближены в зоне контакта на расстояние ~ 0,1 нм. В создании контакта принимают участие взаимодействия раз-

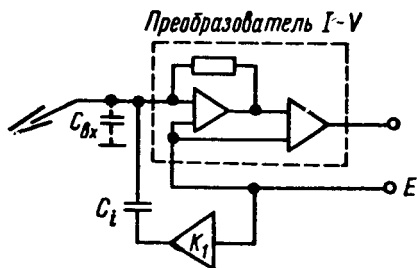


Рис. 77. Схема компенсации входной электрической емкости, защищающая преобразователь ток — напряжение от перегрузок (объяснение см. в тексте)

личных типов: ионные связи между положительно заряженными группами мембраны и отрицательными группами стекла, водородные связи между атомами N и O фосфолипидов и атомов O на поверхности стекла,  $Ca^{2+}$ -мостики между отрицательно заряженными группами стекла и мембраны, межмолекулярные ван-дер-ваальсовы взаимодействия.

Гигаомные контакты между мембраной и стеклом образуются при условии, что клеточная поверхность лишена загрязнений и очищена от внеклеточного матрикса, образованного коллагеном и гликопротеинами. Некоторые клетки, в частности культивируемые миоциты и клетки спинного мозга, а также хромаффинные клетки, выделенные из надпочечников, могут быть использованы для электрических измерений без какой-либо предварительной обработки.

Варианты измерений. Контакт между мембраной и стеклом обладает высокой механической прочностью. Благодаря этому микроучасток мембраны, укрепленный в кончике микропипетки, можно отделить от клетки без заметного изменения сопротивления утечки. Для получения изолиро-

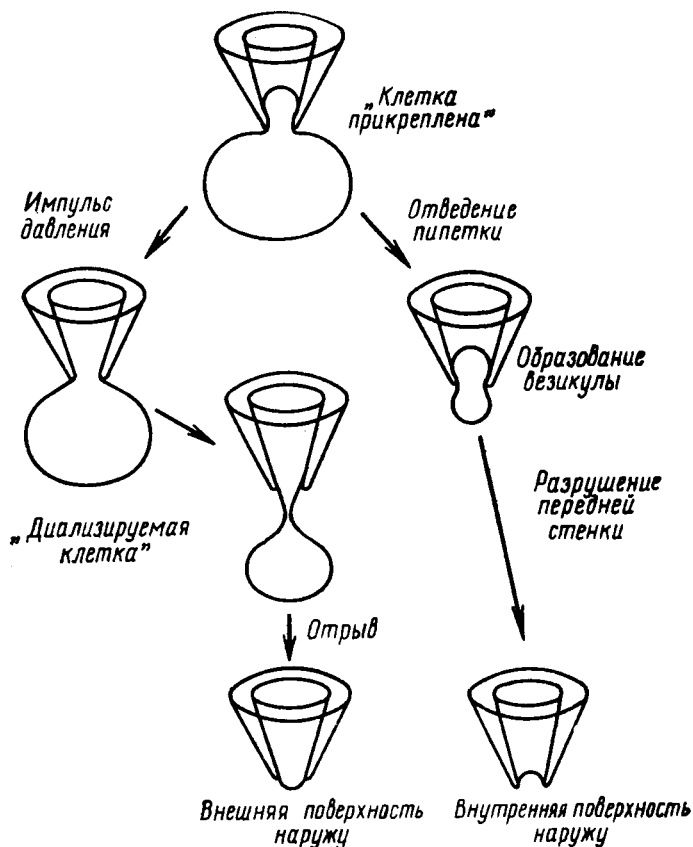


Рис. 78. Манипуляции с микрообъектом и различные варианты измерений трансмембранных токов с помощью микропипеток (остальные объяснения см. в тексте)

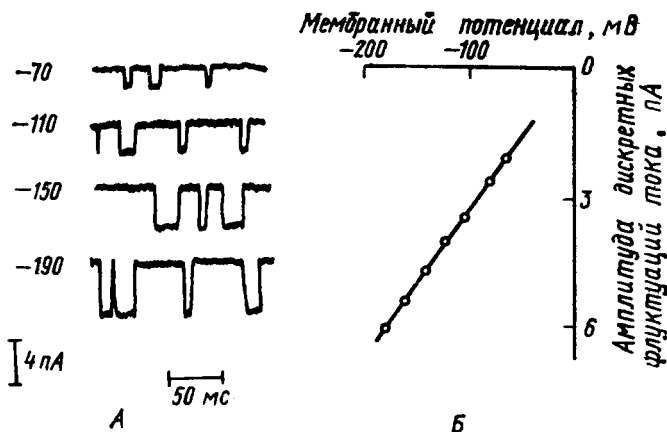


Рис. 79. Токи одиночных ионных каналов, наблюдаемые в присутствии суберилхоллина в пресинаптических мембранах мышечных волокон при разных уровнях мембранного потенциала. А — экспериментальные записи; Б — вольт-амперная характеристика одиночного ионного канала, построенная по приведенным данным

ванного участка мембраны пипетку отводят от клетки на расстояние 20—50 мкм. При этом тяз цитоплазмы обрывается и в торце микропипетки образуется замкнутый пузырек, который можно разрушить, сохранив лишь заднюю мембранную перегородку.

На рис. 78 схематично показаны различные манипуляции с клеткой и изолированными мембранными фрагментами, которые отражают возможности метода микроотведения токов.

Различают несколько вариантов измерений: 1) на микроучастке с прикрепленной клеткой; 2) на изолированном участке мембраны с внешней поверхностью, обращенной наружу; 3) на участке мембраны, внешняя поверхность которого обращена внутрь пипетки (обращенная ориентация пэтка); 4) на диализируемой клетке.

В исходной конфигурации исследуемый участок мембраны не отделен от клетки. Условия измерений наиболее близки к нативным, поскольку не нарушена связь с цитоплазмой. Такой вариант измерений позволяет, например, убедиться в том, что открывание ионных каналов при воздействии на мембранные рецепторы опосредовано внутриклеточным интермедиатом ( $\text{Ca}^{2+}$ , циклические нуклеотиды).

Часть мембраны, втянутую в микропипетку, можно прорвать толчком гидростатического давления или коротким электрическим импульсом, вызывающим пробой мембраны. Разрыв мембраны в кончике микропипетки открывает прямой доступ к внутриклеточной среде и приводит к быстрому замещению ионного состава цитоплазмы на солевой раствор, содержащийся в микропипетке. На диализируемых таким способом клетках изучают ионные токи в режиме фиксации напряжения.

При отведении микропипетки от диализируемой клетки небольшой участок ее мембраны отрывается и закрывает отверстие пипетки так, что внешняя поверхность мембраны оказывается обращенной наружу. Несколько иной прием используют для получения мембраны, внешняя поверхность которой

вывернута внутрь пипетки. В этом случае сначала формируют микропузырек в кончике пипетки, а затем разрушают его переднюю стенку механическим воздействием или кратковременной экспозицией микропузырька на воздухе. При этом сохраняется только тот участок мембраны, внутренняя поверхность которого обращена наружу.

**Емкостные токи.** Переходы между различными вариантами измерений контролируют по изменению емкостных токов. В режиме измерений с прикрепленной клеткой емкость составляет около 100 фемтафарад (фФ), хотя в зависимости от диаметра микропипетки и глубины втягивания мембраны в присоску емкость может варьировать от 10 до 250 фФ. При отведении микроприсоски от клетки и образовании на торце пузырька емкость снижается до 10—20 фФ. Это связано с тем, что суммарная емкость объекта определяется емкостью двух последовательно соединенных конденсаторов  $C_1$  и  $C_2$ , соответствующих внешней и втянутой в микропипетку мембранным поверхностям. Полная емкость равна  $C = C_1 C_2 / (C_1 + C_2)$ . При отрывании пузырька площадь свободной поверхности уменьшается (уменьшение  $C_1$ ) и соответственно уменьшается суммарная емкость. Последующий разрыв одной из полусфер везикулы сопровождается возрастанием емкостных токов, поскольку емкость одной мембраны больше емкости двух последовательно соединенных мембран.

Примеры регистрации токов одиночных каналов с помощью присасывающих микропипеток приведены на рис. 79.

## § 10. Метод внутриклеточного диализа

Электроды, совмещенные с микроприсоской, оказались удобным инструментом и для регистрации интегральных токов относительно мелких клеток.

Для получения диализуемой клетки необходимо разрушить мембрану, отделяющую цитоплазму от заполняющего микропипетку раствора. Если сопротивление клетки намного больше сопротивления микропипетки, то потенциал внутреннего объема диализуемой клетки в точности равен потенциалу пипетки. Иными словами, все напряжение между электродом в пипетке и внешним электродом падает на клеточной мембране, а падение напряжения на сопротивлении микропипетки пренебрежимо мало. Таким образом, для фиксации напряжения и регистрации трансмембранного ионного тока на диализуемых клетках достаточно иметь систему из двух электродов, что позволяет отказаться от трех- и четырех-электродных схем (см. § 4 этой главы).

Упрощенная схема измерений ионных токов в режиме фиксации потенциала на диализуемых клетках показана на рис. 80. На практике сигнал от электростимулятора включают в цепь не непосредственно, а через сумматор, что позволяет прикладывать к мембране как кратковременные импульсы напряжения, так и постоянный потенциал, который может быть равен потенциалу покоя или отличаться от него. Сумматор позволяет комбинировать командные напряжения от разных источников и выполнять программу из двух или нескольких импульсов, используя простые электростимуляторы.

Суммарный ток, протекающий через пипетку, представляет собой помимо ионного тока ток утечки, идущий в обход мембраны.

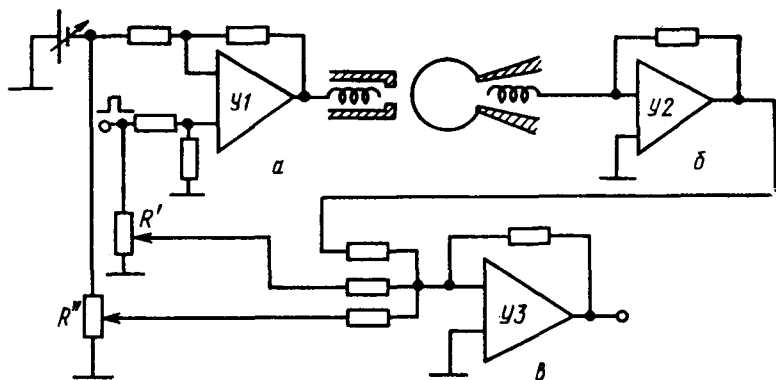


Рис. 80. Регистрация ионных токов на диализируемой клетке:

*a* — блок задаваемых напряжений, собранный на основе сумматора; *б* — регистратор тока; *в* — блок компенсации тока утечки; У1—У3 — усилители 574УД1А; остальные объяснения см. в тексте

Для вычитания тока утечки в систему регистрации вводят дополнительный блок, представляющий сумматор. На вход поступают выходное напряжение с преобразователя ток — напряжение, пропорциональное суммарному току пипетки, и напряжения, пропорциональные поддерживаемому потенциалу и командному ступенчатому импульсу. Подбором переменных резисторов  $R'$  и  $R''$  во входной цепи удается скомпенсировать ток утечки.

Пипетки для внутриклеточного диализа готовят из стеклянных и полиэтиленовых трубок. Сопротивление утечки в области контакта клетки с торцом полиэтиленовой пипетки достаточно велико (20—60 МОм) для регистрации трансмембранных токов на крупных нейронах моллюсков и нейронах млекопитающих.

Отдельные стадии процесса получения диализируемой клетки контролируют по значению емкостных токов. Измерения проводят в следующем порядке. Микропипетку, заполненную раствором с низкой концентрацией  $Ca^{2+}$ , подводят вплотную к клетке, добиваясь резкого повышения сопротивления между измерительными электродами. Затем потенциал пипетки смещают до уровня потенциала покоя (около — 70 мВ для животных клеток) и накладывают прямоугольные импульсы напряжения амплитудой в несколько милливольт. Емкостные токи, обусловленные зарядкой емкости микропипетки и прикрепленным участком мембраны, компенсируют, а затем разрывают мембрану в торце пипетки импульсом отрицательного давления. Разрыв сопровождается резким увеличением емкостного тока. Этот дополнительный ток обусловлен зарядкой емкости всей клеточной поверхности. На этом этапе необходимо скомпенсировать емкостный ток мембраны, амплитуда которого настолько велика, что может переводить преобразователь ток — напряжение в область перегрузки.

Значение и скорость спада емкостного тока зависят от сопротивления микропипетки и емкости клеточной мембраны. Максимальное значение тока определяется величиной последовательного сопротивления: чем меньше сопротивление пипетки  $R_{п}$ , тем больше пиковое значение емкостного тока. Постоянная времени спада емкостного тока определяется произведением  $R_{п}$  и емкости мембраны. Чем больше  $R_{п}$ , тем дольше затягивается процесс зарядки

мембранной емкости, тем хуже временное разрешение метода. Влияние  $R_{\Pi}$  особенно сильно сказывается при работе с клетками крупных размеров, у которых относительно велика площадь поверхности и мембранная емкость. Поэтому для улучшения качества фиксации потенциала важно использовать пипетки с малым сопротивлением (не более 5 МОм).

Раствор, заполняющий микропипетку, быстро обменивается с внутриклеточным содержимым. Поэтому заполняющий раствор должен быть близким по составу к внутриклеточной среде. Этот раствор обычно включает  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$ , а также буферные системы, обеспечивающие необходимый уровень pH и концентрации  $Ca^{2+}$ . В типичном случае раствор содержит 140 мМ KCl; 2 мМ  $MgCl_2$ ; 11 мМ ЭГТА, нейтрализованного раствором KOH; 1 мМ  $CaCl_2$ ; 10 мМ NEPES-KOH, pH 7,2. Концентрации ЭГТА и  $Ca^{2+}$  выбирают с таким расчетом, чтобы концентрация свободного  $Ca^{2+}$  составляла около  $10^{-8}$  М. При концентрации  $Ca^{2+}$  свыше 1 мкМ происходит частое закупоривание диализирующих микропипеток.

Типичные значения емкости мембраны у клеток размером 10—20 мкм составляют 5 пФ, а сопротивление — 10 ГОм. В случае использования микропипеток с сопротивлением 4 МОм скорость отработки системы фиксации потенциала ( $\tau = R_{\Pi}C$ ) составляет ~ 20 мкс. При сопротивлении утечки 20 ГОм уровень флуктуаций тока в интервале частот от нуля до 40 Гц составляет около 0,15 пА (среднеквадратичное отклонение).

Качество фиксации потенциала зависит от размера диализируемых клеток. Это связано с тем, что в зависимости от размера меняется соотношение между последовательным  $R_{\Pi}$  и сопротивлением клеточной мембраны. Приемлемым можно считать режим, когда падение напряжения на  $R_{\Pi}$  не превышает 3 мВ. При  $R_{\Pi} = 3$  МОм максимально допустимый ток, создающий ошибку фиксации в 3 мВ, равен 1 нА. В аксолеме кальмара плотность ионного тока при деполяризации на 100 мВ достигает 3—5 мА/см<sup>2</sup>. Если мембрана диализируемой клетки подобна по свойствам аксолеме кальмара, то предельно допустимая площадь поверхности равна  $3 \cdot 10^{-7}$  см<sup>2</sup>, что соответствует диаметру клетки 3 мкм. Однако в действительности ограничения по размеру не столь жестки, так как у большинства клеток плотность ионных токов в 10—50 раз меньше, чем в аксоне кальмара. Поэтому диаметр клеток, пригодных для опытов, может быть в 3—7 раз больше рассчитанного значения, т. е. может составлять 10—20 мкм. Использование системы компенсации  $R_{\Pi}$  позволяет на порядок увеличить диапазон предельно допустимых токов и проводить измерения на клетках с диаметром 30—70 мкм.

Выравнивание ионного состава в кончике пипетки и внутри клетки происходит за время около 15 с. Водорастворимые белки должны диффундировать в пипетку с временем порядка 3 мин. Потеря внутриклеточных компонентов может модифицировать ионные каналы мембран. Именно этим объясняется постепенное исчезновение  $Ca^{2+}$ -токов в диализируемых нейронах после прорыва мембраны в торце пипетки.

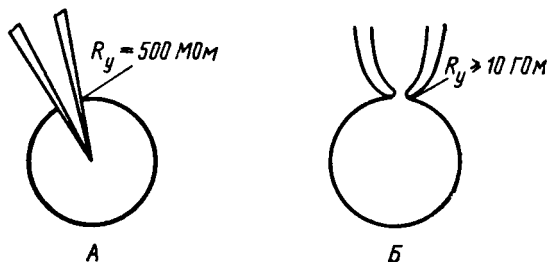
На рис. 81 отражены различия регистрации биопотенциалов с помощью внутриклеточных микроэлектродов и присасывающих электродов. Различия заключаются в следующем.

1. Введение микроэлектродов в клетки с диаметром менее 20 мкм приводит, как правило, к их повреждению. В отличие от этого контакт с микроприсоской не вызывает значительного повреждения клетки. Благодаря этому для внутриклеточного диализа пригодны как относительно крупные, так и мелкие клетки с минимальным размером до 10 мкм.

2. Контакт стеклянной микроприсоски с клеточной мембраной обладает более высоким сопротивлением по сравнению с сопротив-



Рис. 81. Сравнение стандартного микроэлектродного метода регистрации мембранного потенциала (А) и методов регистрации потенциала и фиксации напряжения с помощью диализирующей микропипетки (Б)



лением изоляции в области контакта плазматической мембраны с внутриклеточным электродом, которое обычно не превышает 500 МОм.

3. Собственное сопротивление микропипеток, используемых для внутриклеточного диализа, намного ниже сопротивления стандартных микроэлектродов; типичные значения для микроприсосок и микроэлектродов составляют 4 и 100 МОм.

4. Утечка электролита из кончика микроэлектрода — нежелательный фактор, который приходится учитывать при микроэлектродном отведении. Использование диализирующих микропипеток обеспечивает быстрый обмен ионов между цитоплазмой и микропипеткой и дает возможность контролировать ионный состав цитоплазмы.

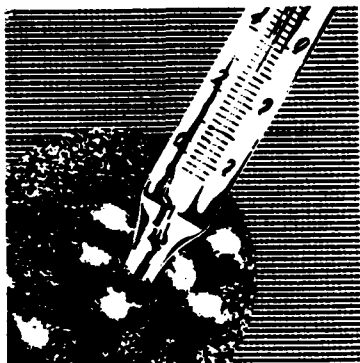
Важное преимущество метода микроотведения с использованием микроприсосок состоит в том, что данный метод обеспечивает принципиальную возможность регистрировать на мембране одних и тех же клеток как интегральный ионный ток, так и ионные токи одиночных ионных каналов. Совмещение двух независимых подходов дает большую информацию о ион-транспортных системах, чем каждый из методов в отдельности. Основные трудности анализа интегральных (макроскопических) токов возбудимых мембран состоят в следующем.

1. При регистрации интегральных токов невозможно добиться идеального разделения тока на отдельные компоненты, свойственные каналам одного вида. Даже подбор блокаторов и ионного состава сред не обеспечивает полного разделения суммарного тока на независимые компоненты.

2. Последовательное сопротивление существенно сказывается в экспериментах по фиксации потенциала целых клеток, но его влияние практически полностью устранено при регистрации тока одиночных каналов на микроучастках клеточной мембраны. Это связано с тем, что сопротивление системы «мембрана с утечкой» намного больше сопротивления микропипетки.

3. При прохождении макроскопических токов может происходить накопление ионов в примембранных областях или уменьшение их концентрации, что сказывается на кинетике ионных токов. Токи через одиночный канал крайне малы и не могут вызвать сколько-нибудь значительных изменений примембранных концентраций.

4. В классическом методе фиксации напряжения трудно отличить потенциалзависимость проводимости одиночных каналов от потенциалзависимости воротного процесса, поскольку изменения проводимости могут быть вызваны как изменением числа открытых каналов, так и изменением проводимости отдельных каналов. При регистрации токов одиночных каналов изменения этих двух типов легко различимы, поскольку измеряемые параметры несут непосредственную информацию о проводимости каналов.

Калориметрические методы исследования  
биополимеров и мембранных систем

Поглощение или выделение теплоты — одно из наиболее универсальных проявлений огромного числа физических, химических и биологических процессов. Тепловой эффект процесса представляет собой фундаментальную термодинамическую характеристику, количественное измерение которой открывает широкие возможности для выяснения механизма процесса и решения ряда физико-химических проблем. Совокупность методов оценки тепловых эффектов, сопровождающих различные процессы, формирует самостоятельный раздел науки, получивший название *калориметрия*.

Обычно тепловые измерения проводят при постоянном давлении  $p$ . В этих условиях изменение внутренней энергии системы  $\Delta U$  в результате химических реакций или структурных превращений определяется некоторым количеством выделившейся теплоты, называемой теплотой реакции  $\Delta Q$ , и работой расширения  $p\Delta U$ :

$$\Delta U = U_2 - U_1 = \Delta Q - p\Delta U,$$

откуда  $\Delta Q = \Delta U + p\Delta U = \Delta H$ , где  $\Delta H$  — изменение энтальпии системы. Следовательно, тепловой эффект реакции при постоянном давлении целиком определяется изменением энтальпии системы.

Существующие в настоящее время калориметрические методы условно разделяют на три основных группы: 1) методы измерения теплоты сгорания и теплотворной способности (сравнительно мало применяются в биологии и здесь подробно рассматриваться не будут); 2) методы реакционной (изометрической) калориметрии и 3) методы измерения теплоемкости, энтальпии и энтропии в виде функ-

ции наиболее фундаментальной физической переменной — температуры (*сканирующая калориметрия*).

Калориметры, в которых практически вся выделяющаяся теплота вызывает изменение их температуры  $\Delta T$ , позволяют измерить общий тепловой эффект процесса  $\Delta Q = C \Delta T$ , где  $C$  — теплоемкость калориметра, или тепловое значение калориметра, т. е. количество теплоты, необходимое для нагревания калориметрической системы на 1 град. Такие калориметры называют *интеграторами*. Калориметры, позволяющие измерять тепловую мощность  $\Phi$  и ее изменение во времени, т. е. «термокинетику» данного процесса ( $\Phi(t) = dQ/dt$ ), называют измерителями мощности или *калориметрами-осциллографами*.

Собственно калориметр представляет собой сосуд, в котором протекают измеряемые тепловые процессы. Вызываемые ими изменения температуры приводят к возникновению теплообмена с внешней средой. Тепловой поток, который устанавливается между калориметрической системой и средой, тем больше, чем больше разность температур и теплопроводность разделяющей среды.

Существует два принципиальных типа калориметров, различающихся теплопроводностью оболочки, отделяющей калориметрическую систему от внешней среды. Если калориметрическая система окружена совершенным термическим изолятором, т. е. теплопроводность равна нулю, то калориметр называется *адиабатным* (непроницаемым для теплоты). Напротив, в *изотермических* калориметрах теплопроводность очень велика, теплота не аккумулируется в калориметре, а быстро переходит во внешнюю среду. Разность температур между калориметром и средой здесь всегда мала, и для измерения тепловых эффектов в этом случае требуется не термометр, а прибор, измеряющий поток выделяющейся теплоты.

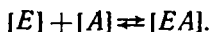
В последнее время широкое распространение получили калориметры-осциллографы комбинированного типа, в которых осуществляется значительный теплообмен между калориметрическим сосудом и вспомогательными частями прибора, но в то же время вся система в целом максимально изолируется от внешней среды. При этом в каждый момент времени центральная часть калориметра должна находиться в состоянии, которое зависит только от производимой в данный момент тепловой мощности. В общем случае для выполнения этого условия необходимо обеспечить предельно малую тепловую инертность системы, что достигается при большом отношении поверхности к объему образца, т. е. при минимальном количестве (объеме) образца. Выполнение этого условия в сочетании с чрезвычайно высокой чувствительностью системы регистрации тепловых эффектов реализуется во всех основных типах *микроккалориметров*.

## § 1. Метод реакционной или изотермической микрокалориметрии

Метод реакционной микрокалориметрии используют главным образом для определения тепловых эффектов взаимодействия различных соединений при постоянной температуре и для изучения кинетики реакций или процессов. В связи с этим техника реакционной микрокалориметрии отличается целым рядом специфических особенностей. Кроме необходимости обеспечения высокой чувствительности большие сложности обусловлены проблемой старта — началом химической реакции или процесса. Как правило, старт осуществляют путем смешивания компонентов реакций. Схематично процесс представляют следующим образом: 1) термостатирование реагентов; 2) приведение реагентов в прямой контакт и 3) перемешивание системы. Обычно смесители работают по трем основным принципам: 1) механическое разрушение перегородки (обычно стеклянной); 2) пространственное перемещение перегородки и 3) изменение положения компонентов в системе (переворачивание).

Основные сложности при смешивании в калориметрах состоят в том, что любая работа по смешиванию переходит в теплоту. Кроме того, значительные тепловые эффекты могут возникать за счет испарения растворителя, обусловленного небольшими изменениями суммарного объема жидкой фазы и давления в калориметрической кювете. В последнее время в биологических исследованиях находят все большее применение смесители (кюветы) проточного типа. Принцип действия проточных калориметров состоит в непрерывном перемешивании двух потоков, содержащих реагенты, и измерении разницы температур растворов до и после перемешивания. Растворы подаются в микрокалориметр прецизионными насосами, чрезвычайно высокая стабильность работы которых обеспечивает высокую чувствительность приборов, работающих обычно в дифференциальном режиме.

Для нахождения термодинамических параметров исследуемой реакции предложено множество способов разной степени сложности. Один из наиболее простых и широко применяемых способов используют для расчета реакции образования комплекса с участием водородных связей между белком  $E$  и произвольным агентом  $A$ , образующим с белком комплекс в соотношении 1:1:



Измерение тепловых эффектов процесса при постоянной концентрации белка и изменяющейся концентрации агента позволяет получить концентрационную зависимость теплового эффекта реакции (рис. 82).

Пренебрегая изменением концентрации  $A$  за счет образования комплекса ( $[A]$  значительно превышает  $[E]$ ), концентрацию белка в системе представляют как  $[E] = [EA]/(K[A] + [EA])$ ,

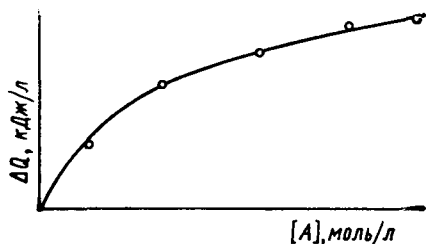


Рис. 82. Зависимость теплового эффекта реакции ( $\Delta Q$ ) от концентрации произвольного агента ( $A$ ), образующего с белком комплекс в соотношении 1 : 1

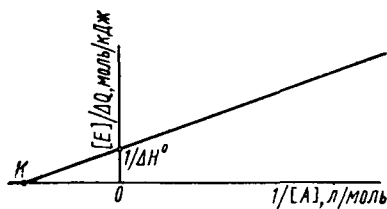


Рис. 83. Способ нахождения константы равновесия ( $K$ ) и стандартной энтальпии ( $\Delta H^\circ$ ) реакции комплексообразования по экспериментальным данным, представленным в координатах  $([E]/\Delta Q) \div (1/[A])$

где  $K$  — константа равновесия. Полагают, что тепловой эффект  $\Delta Q$  взаимодействия прямо связан с концентрацией образующегося комплекса:  $\Delta Q = \Delta H^\circ [EA]$ , где  $\Delta H^\circ$  — стандартная энтальпия реакции.

Разделив первое уравнение на второе, получают уравнение

$$\frac{[E]}{\Delta Q} = \frac{1}{K[A]\Delta H^\circ} + \frac{1}{\Delta H^\circ}. \quad (V.1.1)$$

Из (V.1.1) определяют  $K$  и  $\Delta H^\circ$  графическим путем, если экспериментальную зависимость  $\Delta Q$  от  $[A]$  представить в координатах  $([E]/\Delta Q) \div (1/[A])$  (рис. 83).

Изменение свободной энергии  $\Delta G^\circ$  и энтропии  $\Delta S^\circ$  реакции рассчитывают из уравнений

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K; \quad \Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ.$$

Даже в самом простом случае строгая интерпретация полученных данных требует осторожности. Как правило, неизвестно, происходит ли самая простая реакция комплексообразования в одну стадию. Суммирование тепловых эффектов разных стадий может привести к явлению частичной тепловой компенсации. Более того, в образовании теплового эффекта кроме непосредственно реакций образования комплекса, т. е. суммы тепловых эффектов образования всех связей в комплексе, могут участвовать тепловые эффекты конформационных перестроек белка и сопутствующих гидратационных изменений в системе. В ряде случаев перечисленные эффекты удается учесть с помощью независимых данных и расчетов; работы в этом направлении развиваются, так как реакционная калориметрия представляет собой фактически единственный экспериментальный метод исследования термодинамики при постоянной температуре.

## § 2. Дифференциальная сканирующая микрокалориметрия

Невозможность получения максимальной чувствительности в приборах, имеющих один микрокалориметрический элемент, обусловлена рядом причин. ЭДС системы детекторных термопар  $E$  пропорциональна разности температур между температурой образца — внутренней оболочкой микрокалориметрического элемента ( $T_i$ ) и внешним эталоном температуры — внешней оболочкой ( $T_e$ ):

$$E = f(T_i - T_e).$$

Следовательно, на  $E$  оказывают влияние случайные изменения температуры внешней оболочки  $\Delta T_e$ , которые в лучшем случае ограничиваются величиной  $\sim 10^{-3}$  град. Электрическая же схема прибора позволяет измерять изменения температуры  $\Delta(T_i - T_e) \sim 10^{-6}$  град и менее. Такая чувствительность не может быть реализована в одиночном калориметре.

Гораздо более высокая чувствительность достигается при использовании двойных калориметров, работающих по дифференциальной схеме: две одинаковые калориметрические ячейки располагаются в аналогичных условиях внутри общего блока с общей внешней оболочкой. В таких калориметрах добиваются практически полного равенства констант времени микрокалориметрических элементов:  $\tau = C/P$ , где  $C$  — теплоемкость ячейки,  $P$  — коэффициент тепловых потерь. Высокая чувствительность относительных (дифференциальных) измерений в этих приборах обеспечивается за счет того, что ячейки имеют общую температурную точку  $T_e$ . В условиях температурного сканирования дифференциальные тепловые измерения в таких приборах могут осуществляться двумя методами.

*Метод дифференциального термического анализа (ДТА)* сводится к регистрации разности температур между двумя тождественными ячейками с образцом и контрольным препаратом (эталон), прогреваемыми с одинаковой мощностью. Другой метод — *дифференциальной сканирующей микрокалориметрии* — основан на измерении разности мощностей, подводимых к ячейкам, прогреваемым со строго одинаковой скоростью. Этот метод позволяет количественно оценить тепловые эффекты (изменения теплоемкости, теплоты фазовых переходов) исследуемых систем.

Для определения теплоемкости измеряют количество теплоты, необходимое для увеличения температуры образца на единицу (градус) при постоянном давлении:

$$C_p = (\partial H / \partial T)_p.$$

Поскольку теплоемкость зависит от температуры, при нахождении теплоты фазовых (структурных) переходов из экспериментально определяемого суммарного количества теплоты, необходимо для увеличения температуры системы в области фазового пере-

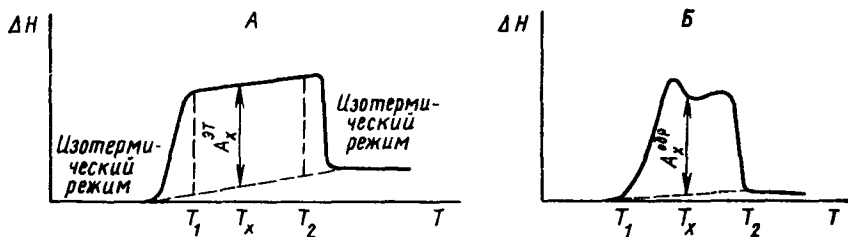


Рис. 84. Экспериментальные кривые, отражающие отклонение от базовой линии при нагреве эталона от температуры  $T_1$  до  $T_2$  (А) и нагреве образца от  $T_1$  до  $T_2$  (Б) (остальные объяснения см. в тексте)

хода, вычитают вклад в энтальпию, обусловленный теплоемкостью системы:

$$\Delta H_C = \int_{T_1}^{T_2} C_p dT.$$

Иными словами, калориметрическую энтальпию перехода находят из площади пика под экспериментальной кривой, обусловленного тепловыми эффектами перехода. Поскольку при температуре, соответствующей середине перехода  $T_{II}$ ,

$$\Delta G_{II} \equiv \Delta H_{II} - T_{II} \Delta S_{II} = 0,$$

энтропию перехода рассчитывают по уравнению

$$\Delta S_{II} = \Delta H_{II} / T_{II}.$$

Это отношение справедливо и для неизотермического перехода, так как работа системы сводится только к расширению при постоянном давлении.

Одним из широко распространенных дифференциальных сканирующих микрокалориметров является прибор ДСМ-2м. Он позволяет проводить следующие стандартные измерения: определение теплового потока  $\Phi_x$  в интересующей точке  $T_x$  заданного температурного интервала; энтальпии  $\Delta H$ -перехода; теплоемкости.

Основные параметры прибора следующие: чувствительность (при соотношении сигнал/шум, равном 1) во всем диапазоне температур сканирования — не более  $10^{-4}$  Вт; дрейф нуля в изотермическом режиме — не более  $10^{-3}$  Вт/ч; скорость сканирования — от 0,5 до 64 К/мин с погрешностью  $\pm 2\%$ ; рабочий диапазон температур — от 123 до 773 К.

Определение теплового потока проводят путем сравнения соответствующих параметров эталона (обычно корунд, прилагаемый в комплекте к прибору) и образца:

$$\Phi_x = \frac{v C_p^{\text{ЭТ}} m^{\text{ЭТ}}}{A_x^{\text{ЭТ}}} A_x^{\text{Обр}},$$



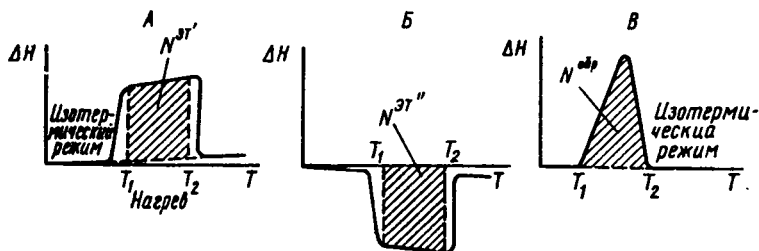


Рис. 85. Экспериментальные кривые отклонения от базовой линии при помещении эталона в рабочую (А) и эталонную (Б) ячейки калориметра и образца в рабочую ячейку калориметра (В)

где  $v$  — скорость сканирования; град·с<sup>-1</sup>;  $C_p^{\text{ЭТ}}$  — удельная теплоемкость эталона при температуре, взятая из аттестационных таблиц в тепловом комплексе;  $m^{\text{ЭТ}}$  — масса эталона, взятая из паспорта;  $A_x^{\text{ЭТ}}$  — амплитуда отклонения от базовой линии при нагреве эталона при температуре  $T_x$  (рис. 84);  $A_x^{\text{обр}}$  — амплитуда отклонения от базовой линии при нагреве образца при температуре  $T_x$  (рис. 84).

Для определения энтальпии  $\Delta H$ -перехода используют метод сравнения с эталоном-корундом, в основе которого лежит расчет:

$$\Delta H = \Delta H^{\text{ЭТ}} m^{\text{ЭТ}} N^{\text{обр}} / (m^{\text{обр}} N^{\text{ЭТ}}),$$

где  $N^{\text{ЭТ}} = (N^{\text{ЭТ}'} + N^{\text{ЭТ}''})/2$ ;  $N^{\text{ЭТ}'}$  и  $N^{\text{ЭТ}''}$  — площади под кривой, измеренные при помещении эталона поочередно в рабочую и эталонную ячейки калориметра;  $N^{\text{обр}}$  — площадь под кривой, измеренная при помещении образца в рабочую ячейку (рис. 85);  $\Delta H^{\text{ЭТ}} = H_{(T_2)} - H_{(T_1)}$ ;  $H_{(T_2)}$  и  $H_{(T_1)}$  — удельные энтальпии эталона при температурах  $T_2$  и  $T_1$  (из аттестационной таблицы);  $m^{\text{ЭТ}}$  — масса эталона (из паспорта);  $m^{\text{обр}}$  — масса образца. Удельную теплоемкость при заданной температуре определяют по уравнению

$$C_p^{\text{обр}} = A_x^{\text{обр}} m^{\text{ЭТ}} C_p^{\text{ЭТ}} / (A_x^{\text{ЭТ}} m^{\text{обр}}),$$

где  $C_p^{\text{ЭТ}}$  — удельная теплоемкость эталона при заданной температуре (из аттестационной таблицы). Остальные обозначения даны ранее.

С помощью микрокалориметра ДСМ-2м исследуют тепловые параметры структурных (фазовых) превращений липидов в природных и искусственных мембранах. Важное достоинство данного микрокалориметра — возможность проведения измерений в отрицательном диапазоне температур. Необходимость этого обусловлена тем, что большинство природных мембран содержит ненасыщенные липиды, точка фазовых переходов которых лежит ниже 0°С. Определение термодинамических параметров этих переходов, выяснение роли липидного состава, влияния эффектов гидратации, ионной силы и рН на эти параметры — наиболее типичные задачи, решаемые с помощью микрокалориметров типа ДСМ-2 м.

## Примерное построение учебной задачи

1. Ознакомление с принципом работы микрокалориметра ДСМ-2м, его конструкцией, основными характеристиками и методами приготовления образцов.

2. Изучение зависимости амплитуды теплового эффекта от количества липида в образце. Результаты представляют в виде графика.

3. Определение точек основного фазового перехода различных индивидуальных и природных липидов. Результаты представляют в виде таблицы.

4. Исследование зависимости положения максимума фазового перехода от степени гидратации липида (количество воды в системе изменять от 0 до 15%).

5. Исследование зависимости  $T_{п}$  от ионной силы и pH раствора.

При выполнении задачи могут быть использованы как суммарные липиды из природных источников, так и любые индивидуальные липиды.

### § 3. Дифференциальные адиабатные сканирующие микрокалориметры

В настоящее время метод дифференциальной сканирующей микрокалориметрии применяется для исследования всех основных классов биополимеров: глобулярных и фибриллярных белков, нуклеиновых кислот, а также фосфолипидов и биологических мембран — микросом печени, эритроцитов, хлоропластов и др. Эксперименты проводят, как правило, в разбавленных растворах, в которых можно пренебречь эффектами межмолекулярных взаимодействий. Однако в таких растворах тепловые эффекты, обусловленные макромолекулами, чрезвычайно малы. Например, теплоемкость биополимеров в 0,3%-ном растворе составляет лишь тысячную долю от общей теплоемкости растворителя. Поэтому определение с достаточной степенью точности тепловых эффектов в этих условиях на фоне постоянно вводимой в систему теплоты требует сверхпрецизионных методов.

Детальное исследование внутримолекулярных процессов стало возможным лишь после создания принципиально нового прибора — *дифференциального адиабатного сканирующего калориметра*. Чувствительность этого прибора на три порядка превосходит чувствительность обычных приборов неадиабатного типа. Широкое распространение и мировую известность получил прибор ДАСМ-1м и затем разработанный на его основе усовершенствованный вариант микрокалориметра — ДАСМ-4.

Основные эксплуатационные параметры прибора ДАСМ-1м: рабочий диапазон температур — 0—100 °С, скорость прогрева — 0,1—2,0 град/мин, рабочий объем кюветы — 1,0 мл, чувствительность по теплоемкости —  $1,6 \times 10^{-5}$  Дж·град<sup>-1</sup>·мл<sup>-1</sup>, точность определения относительной теплоемкости —  $8 \cdot 10^{-5}$  Дж·град<sup>-1</sup>·мл<sup>-1</sup>, точность регистрации температуры — 0,1 град.

Уникальная чувствительность этих приборов определяется совокупностью трех методических принципов, заложенных в их основу: дифференциальной схемы измерения, непрерывного прогрева

с точно заданной скоростью и полной адиабатизации измерительных ячеек.

Проблема точности микрокалориметрических измерений непосредственным образом связана с проблемой точности заполнения кюветы и конструктивными особенностями калориметрического блока. В приборе ДАСМ-1м эти проблемы решены путем применения специального неразборного калориметрического блока с системой адиабатизации на тепловых экранах (рис. 86). Применение внешнего заполнения с помощью подводящих капиллярных трубок и проведение измерений при повышенном постоянном давлении позволяет повысить надежность калориметрических измерений, воспроизводимость результатов и упростить процедуру измерения.

Используемый в приборе принцип адиабатизации заключается в следующем. При подаче электрического тока в нагреватели микрокалориметрических ячеек температура последних повышается. Одновременно пропорционально-интегральные регуляторы автоматически обеспечивают с высокой степенью точности выравнивание температуры тепловых экранов с температурой ячеек. В результате этого камеры оказываются в условиях, близких к адиабатным, когда практически отсутствует теплообмен камер с окружающей средой. Эти условия обеспечиваются в широком температурном диапазоне при прогревании ячеек с постоянной скоростью.

#### § 4. Калориметрические измерения

Основные трудности калориметрических измерений связаны с интерпретацией экспериментальных кривых в условиях, когда термоиндуцированный переход в индивидуальных соединениях проходит в несколько стадий, а также при усложнении состава системы и формы калориметрической кривой.

Сравнительно проста интерпретация калориметрических кривых, описывающих одиночный термоиндуцированный переход в индивидуальном соединении. Это относится к микрокалориметрическим кривым термоденатурации большого числа глобулярных белков, некоторых фибриллярных белков (например, проколлагена), ДНК и мембранных структур из индивидуальных (синтетических) липидов. Резко усложняется интерпретация многокомпо-

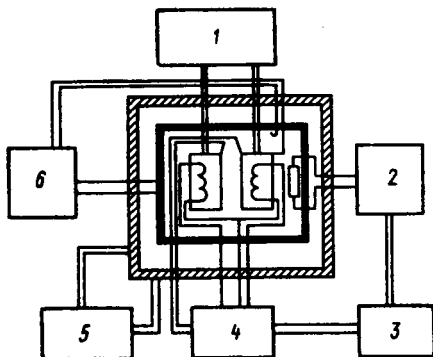


Рис. 86. Схема микрокалориметра:  
 1 — моностаб, 2 — термометр, 3 — самописец,  
 4 — измеритель теплового эффекта, 5 — терморегулятор термостата, 6 — терморегулятор адиабатизирующей оболочки

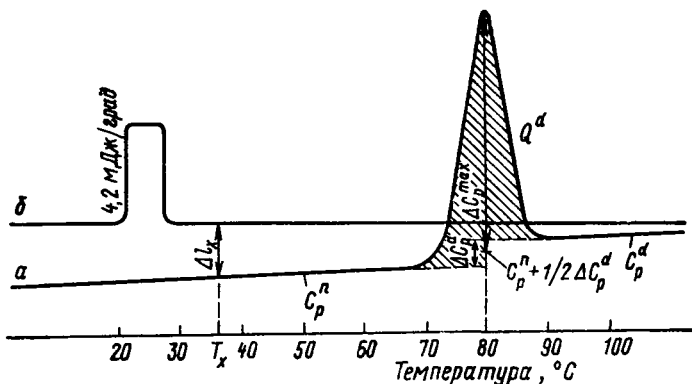


Рис. 87. Типичная экспериментальная калориметрическая кривая процесса денатурации лизоцима (а) и базовая линия с калибровочной меткой, полученная при заполнении обеих ячеек растворителем (б) (остальные объяснения см. в тексте)

нентных калориметрических кривых теплопоглощения в прогреваемых растворах индивидуальных РНК и ряда больших белков. Биологические мембраны и их фрагменты — несравненно более сложный объект для калориметрических исследований. Трудности заключаются главным образом в невозможности однозначно интерпретировать структурные переходы, выделить их и определить энтальпию отдельного перехода.

Рассмотрим результаты микрокалориметрических измерений на примере простого и подробно изученного процесса — денатурации глобулярного белка лизоцима. Типичная экспериментальная кривая приведена на рис. 87. Наряду с микрокалориметрической записью прогреваемого раствора лизоцима (1,6 мг/мл, рН 4,5) приведена базовая линия с калибровочной меткой, полученная при заполнении обеих камер растворителем. Из рисунка видно, что теплоемкость раствора белка значительно ниже теплоемкости растворителя. По снижению линии записи от базовой линии  $\Delta I_x$  рассчитывают парциальную теплоемкость белка при любой температуре  $T_x$  с учетом того, что

$$-\Delta I_x = C_p^b m^b - C_p^{\text{раст}} \Delta m^{\text{раст}},$$

где  $C_p^b$  и  $C_p^{\text{раст}}$  — парциальная теплоемкость белка и растворителя;  $m^b$  — масса белка в ячейке;  $\Delta m^{\text{раст}}$  — масса вытесненного им растворителя. Так как

$$\Delta m^{\text{раст}} = m^b V^b / V^{\text{раст}},$$

где  $V^b$  и  $V^{\text{раст}}$  — парциальный объем белка и растворителя,

$$C_p^6 = C_p^{\text{раст}} (V^6/V^{\text{раст}} - \Delta l_x/m^6).$$

Таким образом, метод позволяет получить температурную зависимость теплоемкости нативного белка ( $C_p^n$ ) ниже области перехода; температурную зависимость теплоемкости денатурированного белка  $C_p^d$  и разницу теплоемкостей нативного и денатурированного состояний в точке перехода:

$$\Delta C_p^d = C_p^d - C_p^n.$$

Как видно из термограммы (рис. 87) в области  $70^\circ\text{C}$  развивается интенсивное теплопоглощение, связанное с денатурацией белка. По площади денатурационного пика, ограниченного снизу экстраполированными значениями теплоемкости нативного  $C_p^n$  и денатурированного  $C_p^d$  белка, можно определить теплоту денатурации имеющегося в калориметре белка, а отсюда удельную  $\Delta h^d$  и молярную  $\Delta H^d$  энтальпии денатурации:  $\Delta H^d = M\Delta h^d$ , где  $M$  — молекулярная масса белка.

Полная тепловая денатурация глобулярных белков относится к одному из наиболее глубоких типов конформационных переходов, связанных с перестройкой всех нековалентных внутримолекулярных контактов, сопровождающихся резкими изменениями всех физико-химических свойств белков. Этот переход происходит в сравнительно узком интервале температур, определяемом совокупностью внутренних свойств белка и внешних условий. Термодинамический анализ процесса обычно основывается на допущениях, что: 1) денатурация протекает как переход между двумя состояниями, т. е. подобно мономолекулярной химической реакции; 2) все переходы в системе протекают независимо и 3) энтальпия перехода не зависит от температуры. Используя параметр, отражающий степень перехода,  $\Theta = C^n/C^d$ , где  $C^n$  и  $C^d$  — парциальное количество белка в нативном и денатурированном состояниях, константу равновесия нативной и денатурированной формы представляют в виде  $K = \Theta/(1 - \Theta)$ . Тогда эффективную энтальпию перехода находят по уравнению Вант-Гоффа:

$$\Delta H^{vH} = RT^2 d \ln K/dT.$$

Так как в средней точке перехода  $\Theta = 0,5$  (при  $T = T_n$ ), то

$$\Delta H^{vH} = 4RT_n^2 (d\Theta/dT)_{T_n}.$$

Зависимость  $\Theta$  от температуры находят экспериментальным путем с помощью разнообразных методов: оптической спектроскопии, ЯМР и т. д. Эффективную энтальпию перехода определяют и калориметрическим путем, исходя из уравнения

$$(\Delta H^{vH})^2 = 4RT_n^2 (d\Delta H/dT)_{T_n},$$

где

$$(d\Delta H/dT)_{T_n} = (d\Delta H/dT)_{\max} = \Delta C_p^{\max}.$$

Отсюда

$$\Delta H^{vH} = 2T_n \sqrt{R\Delta C_p^{\max}}.$$

Таким образом, сканирующая калориметрия позволяет определить калориметрическую энтальпию денатурации  $\Delta H$ , не прибегая ни к каким допущениям, по площади пика на калориметрической кривой. Из той же экспериментальной кривой, исходя из остроты перехода  $d\Delta H/dT$ , определяют энтальпию Вант-Гоффа.

Значения калориметрической энтальпии денатурации и энтальпии Вант-Гоффа (определяемой по остроте перехода) обычно совпадают у различных глобулярных белков.

Для вычисления температурной зависимости свободной энергии, стабилизирующей нативные белки, используют выражение

$$\Delta G = \Delta H \frac{T_n - T}{T_n} - \int_T^{T_n} \Delta C_p dT + \int_T^{T_n} \frac{\Delta C_p}{T} dT.$$

Плавление ДНК и ее синтетических моделей также проявляется на калориметрической кривой в виде одиночного пика. Этот процесс, протекающий с высокой степенью кооперативности, представляет собой распад двуспиральной структуры на две полинуклеотидные цепи, сворачивающиеся в отдельные хаотические клубки. Отличительная черта процесса — равенство теплоемкостей нативного  $C_p^n$  и денатурированного  $C_p^d$  состояний ДНК. Это сильно упрощает нахождение тепловых эффектов плавления. При условии  $\Delta C_p^d = 0$  упрощается также определение свободной энергии  $\Delta G$  стабилизации нативной структуры ДНК по приведенной выше формуле.

Совершенно иной тип структурных переходов, формирующих также одиночный пик на калориметрической кривой, — *переход гель — жидкокристаллическое состояние* (основной фазовый переход) в мембранных структурах из индивидуальных липидов. В отличие от рассмотренных выше биополимеров степень кооперативности основного фазового перехода липидов в мембранах фактически целиком определяется не внутримолекулярными, а межмолекулярными взаимодействиями. Для этих систем эффективная энтальпия Вант-Гоффа обычно больше калориметрически определяемой энтальпии. В общем виде степень кооперативности процесса задается соотношением

$$\Delta H^{vH} = N\Delta H,$$

где  $N$  — число молекул в так называемой кооперативной единице.

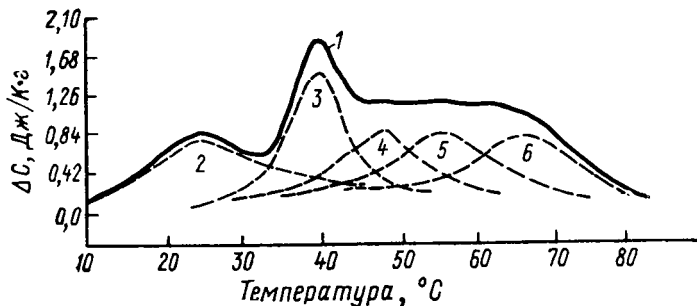


Рис. 88. Экспериментальная термограмма плавления тРНК (1) и результат математического «разложения» термограммы на отдельные кооперативные переходы (2—6), каждый из которых описывается уравнением Вант-Гоффа

Часто степень кооперативности процесса характеризуют параметром кооперативности  $\sigma$ , который находят из выражения

$$\sigma = (\Delta H / \Delta H^{vH})^2.$$

Связь параметра кооперативности с размером кооперативной единицы находят из

$$N = 1/\sqrt{\sigma}.$$

Сопоставление энтальпии Вант-Гоффа и калориметрически определяемой энтальпии позволило определить размеры кооперативной единицы при фазовом переходе большого числа индивидуальных (синтетических) липидов. В зависимости от типа липида и экспериментальных условий размер кооперативной единицы варьирует от десятков до нескольких сотен молекул.

В липидных структурах сложного состава характер термотропных переходов и их интерпретация усложняются. Основные наблюдаемые эффекты: изменение температуры фазового перехода  $T_m$ , возрастание полуширины перехода (снижение кооперативности), изменение энтальпии перехода. В ряде случаев на калориметрической кривой могут проявляться эффекты разделения фаз, т. е. два (или более) максимума на термограмме, каждый из которых обусловлен фазовым переходом одного из компонентов, формирующих при низких температурах самостоятельную микрофазу в мембранах. Этот эффект наблюдается, например, в системах, содержащих два липида, резко отличающихся длиной углеводородных цепей.

Сложные многокомпонентные калориметрические кривые наблюдаются обычно при плавлении РНК, больших белков и субъединиц. Трудности интерпретации этих кривых определяются как сложным многокомпонентным характером самого процесса плавления (денатурации), так и методическими проблемами разделения и определения отдельных тепловых составляющих процесса. Один из пред-

ложенных методов математической обработки таких кривых основан на «разложении» сложных термограмм на отдельные кооперативные переходы, каждый из которых описывается уравнением Ван-Гоффа. Например, термограмму плавления тРНК удалось разложить таким образом на пять составляющих пиков, первый из которых относится к плавлению третичной структуры (20 % общего теплового эффекта, равного 41 Дж/г), остальные — к плавлению четырех спиральных участков в структуре тРНК (рис. 88).

Сложности при работе с биологическими мембранами (фрагментами) заключаются главным образом в невозможности однозначно интерпретировать регистрируемые структурные переходы в терминах термодинамики, определить энтальпию отдельных структурных переходов. Вопрос математической обработки термограмм биологических мембран остается пока открытым. В большинстве исследований, посвященных изучению тепловых эффектов в мембранных системах при температурном сканировании, сделаны попытки качественно связать тот или иной максимум на термограммах с участием тех или иных молекулярных компонентов мембран. При этом обычно полагают, что термообратимые переходы затрагивают липидные компоненты мембран. Важный метод идентификации термотропных переходов — выяснение характера влияния разнообразных внешних факторов на результаты экспериментов. Эти работы лишь начинаются, однако уже сейчас имеющаяся интерпретация в ряде случаев (мембраны *Acholeoplasma laidlawii*, *Escherichia coli*, макрофаги крыс, тени эритроцитов, вирусы и т.д.) представляется достаточно убедительной и интересной. Метод сканирующей микрокалориметрии несомненно перспективен для выяснения механизмов термостабилизации и принципов повышения устойчивости биологических систем к экстремальным температурам.

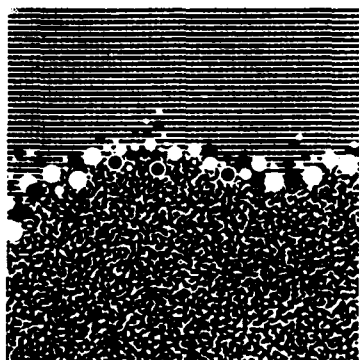
### Примерное построение учебной задачи

1. Ознакомление с принципом работы микрокалориметра ДАСМ-1м (ДАСМ-4), его конструкцией и основными характеристиками.
2. Освоение экспериментальной техники и методик подготовки образцов, заполнения и мытья кювет (ячеек).
3. Запись термограмм глобулярных белков, ДНК или индивидуальных липидов в диапазоне температур 5—95° С.
4. Определение калориметрической энтальпии перехода и вычисление эффективной энтальпии процесса с использованием калибровочных меток. Определение степени кооперативности термоиндуцированного перехода в использованном препарате.
5. Исследование зависимости  $T_{II}$  от ионной силы и рН раствора.



## Глава VI

### Монослой липидов на границе раздела воздух — вода



Исследование мономолекулярных слоев (*монослоев*) дает информацию о таких физических параметрах индивидуальных веществ, как поверхностное давление монослоя, молекулярная площадь вещества в монослое, зависимость поверхностного давления от молекулярной площади. Для смеси веществ можно получить информацию о смешиваемости компонентов, о стехиометрии и энергетике взаимодействий, о сродстве водорастворимых веществ к липидам. *Метод монослоев* служит основой для получения мультислоев ориентированной липидной системы и создания модельных мембран заданного состава и их архитектоники. Монослойную методику используют также на практике, например в микроэлектронной технологии для ориентации и сборки компонентов, в контроле чистоты сред при высоком уровне требования, в экологических работах и др.

Поверхностное натяжение на границе раздела газ — жидкость, или *положительная свободная энергия* образования границы раздела, является условием существования границы раздела. Поверхностное напряжение границы раздела  $\gamma$  определяют как  $\gamma = -\Delta F/\Delta S$ , где  $\Delta F$  — изменение свободной энергии,  $\Delta S$  — изменение площади поверхности.

Свободную энергию образования границы раздела можно рассматривать также как работу, необходимую для переноса молекул жидкости из объема (субфазы) на поверхность раздела фаз. Необходимость такого переноса обусловлена тем, что силы, действующие в субфазе на определенную молекулу со стороны других молекул, скомпенсированы, тогда как на расположенную на поверхности раздела молекулу действуют силы притяжения только со стороны

субфазы. Глубина слоя нескомпенсированных сил на границе раздела определяется характером взаимодействия между молекулами воды. В отсутствие ионов это ван-дер-ваальсовы взаимодействия, интенсивность которых снижается пропорционально седьмой степени расстояния между молекулами. Таким образом, зона нескомпенсированных взаимодействий не превышает нескольких диаметров молекул.

Согласно уравнению Гиббса, поверхностная плотность вещества для адсорбции на поверхности раздела фаз имеет следующее выражение:

$$\Gamma = -[a/(RT)](\partial\gamma/\partial a),$$

где  $\Gamma$  — поверхностная плотность вещества,  $a$  — активность вещества в субфазе.

Если вещество накапливается на границе раздела, то  $\partial\gamma/\partial a$  должно иметь отрицательный знак, поскольку адсорбция на границе раздела, например для липида, должна приводить к снижению измеряемого поверхностного натяжения. Тогда разность  $\gamma_0 - \gamma$  (где  $\gamma_0$  — поверхностное натяжение на границе «чистой» воды,  $\gamma$  — поверхностное натяжение после адсорбции на границе раздела, например, липида) определяют как поверхностное давление адсорбированной пленки.

Монослой на границе раздела можно рассматривать как пленку, в которой развивается давление, равное поверхностному давлению (ПД):

$$\text{ПД} = \gamma_{\text{в}} - \gamma_{\text{раств}},$$

где  $\gamma_{\text{в}}$  и  $\gamma_{\text{раств}}$  — поверхностное натяжение воды и раствора.

### § 1. Методика измерения поверхностного натяжения с использованием пластинки Вильгельми

При измерениях поверхностного натяжения на поверхность воды или водного раствора опускают пластинку прямоугольной формы. Материалом пластинки обычно служит платина, которую прокаливанием легко освободить от следов органических веществ. Используют также стекло и другие материалы. На границе раздела фаз на пластинку действует сила поверхностного натяжения (рис. 89). Эта сила затягивает пластинку в воду, ее значение измеряют устройством, преобразующим механическую силу в электрический

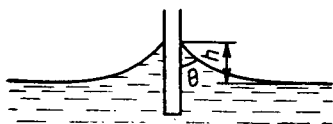


Рис. 89. Взаимодействие пластинки Вильгельми и воды на границе раздела фаз:

$h$  — высота подъема жидкости при контакте с пластинкой Вильгельми,  $\theta$  — краевой угол

сигнал, например механотроном. Измеряемая масса пластинки равна:

$$\omega_{\text{общ}} = \omega_{\text{пл}} + \gamma \cos \theta p,$$

где  $\gamma$  — поверхностное натяжение раствора;  $p$  — периметр пластинки;  $\omega_{\text{пл}}$  — истинная масса пластинки.

Когда на поверхность раздела нанесено очень малое количество вещества,  $\gamma$  равно поверхностному натяжению субфазы воды или раствора. При уменьшении площади раздела происходит снижение  $\omega_{\text{общ}}$ .

**Нанесение образца на поверхность раздела фаз.** Используют чистую дистиллированную воду или растворы, компоненты которых предварительно прокалывают при 500—600°С для удаления органических загрязнений.

**Нанесение образца из раствора органического растворителя.** Вещество, например липид, растворяют в определенном растворителе; обычно используют универсальную смесь гексан: этанол (9:1 по объему). На поверхность воды наносят 1—20 мкл раствора микрошприцем так, чтобы его конец касался поверхности воды. Чтобы насаживание проходило равномерно, пользуются стеклянными пластинками или палочками, по поверхности которых раствор стекает медленнее. Концентрацию вещества в образце рассчитывают по величине молекулярной площади в конденсированном монослое (для липидов 0,2—0,8 нм<sup>2</sup>) и с учетом площади поверхности раздела (удобно наносить такое количество вещества, чтобы его регистрация начиналась при промежуточных значениях поверхности раздела).

**Пример.** При нанесении фосфолипида димиристоксифосфатидилхолина желательно иметь площадь конденсированного слоя 100 см<sup>2</sup>; его молекулярная масса — 697. Количество молекул, которое следует нанести на поверхность раздела, составит:  $100 \text{ см}^2 / 0,5 \text{ нм}^2 = 2 \cdot 10^{18}$ . Так как 1 моль содержит  $6,02 \cdot 10^{23}$  молекул, то надо нанести около 30 имоль фосфолипида. Такое количество вещества по массе равно  $697 \cdot 3 \cdot 10^{-8}$ , т. е. 21 мкг. После нанесения раствора на поверхность выжидают 10—15 мин до полного испарения органического растворителя.

**Нанесение вещества в виде кристалла.** Кристаллы липида аккуратно насаживают на поверхность раздела фаз так, чтобы они оставались на поверхности, не погружаясь в субфазу.

**Осмотическое расплавление вещества.** Этот метод используют для получения фосфолипидных монослоев, содержащих мембранные белки, а также для монослоев чистых липидов, монослоев липосом или мембранных пузырьков. Субфаза должна иметь достаточно высокую ионную силу, например содержать 0,1—0,15 М раствор NaCl.

**Стабильность и скорость сжатия монослоев.** Полученные одним из изложенных методов монослои оказываются нестабильными в том смысле, что в них липид не находится в равновесии с липидом в субфазе. Липид из монослоя при низком ПД постепенно растворяется в субфазе. При увеличении ПД скорость растворения липида замедляется, видимо, за счет усиления ван-дер-ваальсовых и гидрофобных взаимодействий между гидрофобными частями молекул вещества. Отсюда следует, что стабильными могут быть такие монослои липидов, которые формируются из молекул, выходящих из субфазы на поверхность раздела. При этом достигается «равновесие» ПД — ПД<sub>е</sub>. Однако такой метод образования монослоя имеет свои трудности. При ПД > ПД<sub>е</sub> монослой коллапсирует и в виде конденсированной фазы отрывается от границы раздела. При ПД < ПД<sub>е</sub> происходит его растворение в субфазе. Монослой можно считать практически стабильным, если в течение 30 с ПД в условиях «поджатого» монослоя уменьшится не более чем на 5 %. Скорость «поджатия» монослоя рассчитывают не на единицу площади измерения моно-

слоя, а на одну молекулу в монослое. Обычно используют скорость «поджигания», равную  $0,01-0,1 \text{ нм}^2 \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$ . При более высоких скоростях молекулы в монослое не успевают релаксировать, при более низких — возрастает время измерений.

## § 2. Исследование свойств липидных монослоев методом изотерм

**Определение поперечного сечения липидов и их взаимодействия с веществами в субфазе.** Наиболее четкий параметр монослоя — *молекулярная площадь липида* ( $A$ ), т. е. площадь, занимаемая одной молекулой. В конденсированном слое  $A$  определяется при экстраполяции наиболее крутой части изотермы на ось  $x$  графика зависимости ПД от площади монослоя, получаемого при измерениях с помощью двухкоординатного потенциометра. Таким образом, метод монослоев позволяет получать данные о площади поперечного сечения липида в монослое. Для фосфолипидов поперечное сечение зависит от типа головки липида и степени ненасыщенности жирнокислотных цепей. Специфика взаимодействий между компонентами монослоя, а также гидрофильной части молекул и субфазы может изменять величину  $A$ . Ионы и молекулы субфазы влияют на структуру воды в пограничном слое и укладку головок липида на границе раздела.

**Исследование взаимодействия веществ в монослоях.** Снимают серию изотерм монослоев при различном молярном соотношении исследуемого вещества и липида в монослое. По полученным данным строят диаграмму зависимости  $A$  от молярной доли исследуемого вещества в смеси. Такая диаграмма (рис. 90) содержит информацию о комплексах в монослое из холестерина и дигексадецилфосфатидилхолина. Комплексы со стехиометрией 1:1 и 4:1 образуются в присутствии указанных веществ, но добавка в субфазу поликремниевой кислоты обуславливает образование комплексов только со стехиометрией 1:1.

**Определение смешиваемости веществ в монослоях.** Для определения смешиваемости двух компонентов в монослое применяют *правило фаз*. При постоянстве температуры и давления число степеней свободы для бинарного монослоя имеет выражение  $f = c - p + 1$ , где  $c$  — число компонентов,  $p$  — число фаз. Для бинарной системы  $c = 2$  и  $f = 3 - p$ . Если на диаграмме  $F/X$  ( $X$  — состав монослоя,  $F$  — какой-либо параметр монослоя, например коллапс одного из компонентов или фазовый переход одного из компонентов)  $F$  не зависит от  $X$ , то  $f = 0$ . Отсюда  $p = 3$ , т. е. в системе сосуществуют три компонента: два индивидуальных вещества и их смесь. Если  $F$  зависит от  $X$ , то для бинарной системы существуют две степени свободы и  $2 = 3 - p$ , т. е.  $p = 1$ . Эти компоненты смешиваются.

**Определение структурных перестроек в монослоях.** На изотермах липидных монослоев могут быть видны и переходы, обусловлен-

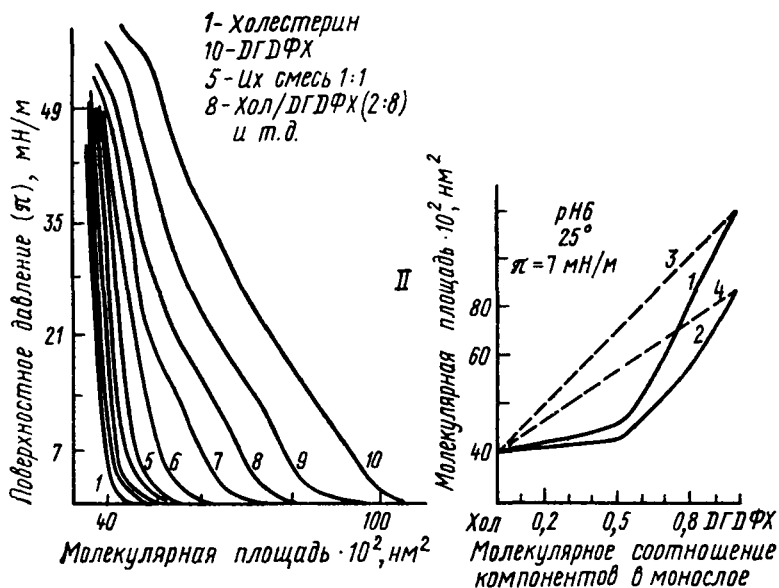


Рис. 90. Взаимодействие в монослоях дигексадецилфосфатидилхолина (ДГДФХ) с холестерином (Хол) в зависимости от присутствия поликремниевой кислоты. I — изотермы монослоев холестерина и ДГДФХ; II — зависимость молекулярной площади в смешанном монослое от состава монослоя: 1 — в присутствии в субфазе поликремниевой кислоты при концентрации 5 мМ в расчете на группы SiO<sub>2</sub>, 2 — в отсутствие поликремниевой кислоты, 3, 4 — диаграммы, построенные в предположении об аддитивности молекулярных площадей компонентов в смешанном монослое

ные изменением ориентации молекул на границе раздела. Так, для молекул, имеющих две гидрофильные группы на концах длинной жирнокислотной цепи, например для широко используемой в качестве флуоресцентного зонда 16 (9-антроилокси)-пальмитиновой кислоты, наблюдается изменение наклона изотермы монослоя этого липида по мере его поджатия. Это изменение интерпретируют как результат отрыва от поверхности раздела одной из гидрофильных групп этого зонда — COOH-группы — с выпрямлением молекулы в монослое. При низком ПД эта молекула «лежит» на поверхности раздела так, что с водой контактируют концевая COOH-группа и CO-группа, соседствующая с антранильным циклом.

**Определение упругих свойств монослоев.** Параметр латеральной сжимаемости монослоев  $c = - (1/A) (\partial A / \partial \pi)_T$ ; используют также обратный параметр — гиббсову упругость монослоев:  $E = - A (\partial \pi / \partial A)_T$ .

### § 3. Анализ и интерпретация форм изотерм

Для монослоев различных липидов на поверхности раздела фаз в определенном диапазоне температур на изотермах обнаруживается плато: по мере снижения  $A$  параметр ПД возрастает незначительно.

Для фосфолипидов плато описывается как переход от жидкорасширенного состояния ( $LE$ ) к жидкоконденсированному ( $LC$ ) и затем к твердоконденсированному ( $SC$ ). Для монослоев ДПФХ эти состояния показаны на рис. 91. До недавнего времени эти переходы, как и теоретические модели таких переходов, объясняли переходом «чапмановского» типа, известного для бислоев, где измерения проводили методом дифференциальной сканирующей калориметрии. Как предполагают, в области плато происходит снижение доли гошротамеров ацильных цепей и возрастание доли трансротамеров. Однако переход  $LE - LC$  наблюдается и для жирных кислот в той области температур, где методом ДСК никаких переходов не обнаруживается.

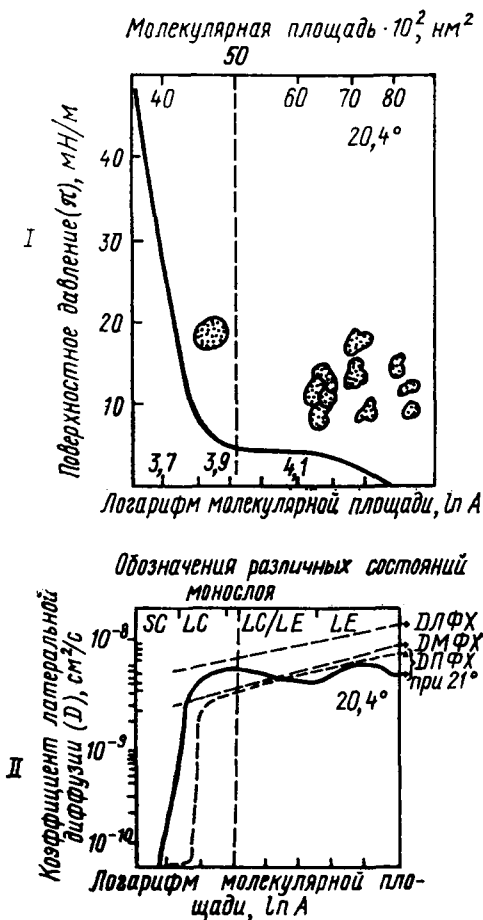


Рис. 91. Изменение свойств монослоев некоторых фосфолипидов в зависимости от молекулярной площади:

I — изотерма дилауритоилфосфатидилхолина (ДПФХ) (показан характер кластерирования липида по данным флуоресцентной микроскопии); II — коэффициент латеральной диффузии ДПФХ при  $20,4^\circ\text{C}$  (сплошная кривая) и монослоев из дилауроилфосфатидилхолина (ДЛФХ), димристоилфосфатидилхолина (ДМФХ) и ДПФХ при  $21^\circ\text{C}$  (показаны пунктиром); остальные объяснения см. в тексте

В последние годы переход  $LE - LC$  для фосфолипидов в монослоях успешно исследован методом флуоресцентной микроскопии с использованием монослоев, содержащих не более 1 мол. % флуоресцентно

меченного фосфолипида (рис. 91). Полученные этим методом данные приведены ниже отдельно для различных областей изотерм.

*LE-область.* При температурах от 20 до 25 °С монослой ДПФХ проявляет присутствие светлых флуоресцирующих и темных нефлуоресцирующих областей. В светлых областях ДПФХ находится в жидком состоянии, в темных — отсутствует (рис. 91, I).

*(LE — LC)-область.* В этой области изотермы проявляют гомогенную флуоресценцию, что объясняется сосуществованием доменов с различными фазами, размер которых сравним с длиной волны возбуждающего света и поэтому неразрешим при наблюдении. Коэффициент латеральной диффузии (*D*) ДПФХ почти такой же, как и в области *LE* (рис. 91, II).

*LC-область.* По мере снижения молекулярной площади отмечается резкое снижение *D*, возрастание сжимаемости монослоя.

*SC-область.* В этой области *D* близок к *D* фосфолипидов в бислоях. Происходящий в конце этой области изотермы коллапс монослоя сопровождается выходом вещества в субфазу, но не обязательно с отрывом от монослоя. Таким образом, область *LE* — двухфазная, *LE — LC* — гомогенная однофазная, *LC* — двухфазная, *SC* — монофазная твердая.

#### § 4. Прикладное значение метода монослоев

**Монослой как детектор.** Если субфаза содержит амфипатические молекулы (с гидрофильной и гидрофобной областями), обладающие определенным сродством к монослою липида, то молекулы из субфазы могут встраиваться в монослой. При этом, если площадь монослоя остается постоянной, наблюдается возрастание ПД; при постоянстве ПД (режим изобар) происходит возрастание суммарной площади монослоя. Могут модифицироваться также упругие свойства монослоя и его поверхностный потенциал. Таким образом, монослой может служить своеобразным детектором, чувствующим присутствие в субфазе молекул, аффинных к монослою. Такое явление в монослое используют для обнаружения различных пахучих веществ, анестетиков и т. п.

**Мультислои Ленгмюра — Блджетта.** Для того чтобы решить многие проблемы исследования молекулярной организации бислоев, необходимо получить препарат мультислоевых ориентированных мембран. Между тем на макроскопическом уровне липиды бислоев в водных дисперсиях имеют анизотропную ориентацию, т. е. препарат имеет полный набор ориентаций липидов и отдельных связей в монослое. Получение препарата с ориентированными компонентами оказывается важным условием при исследованиях методами ЭПР- и ЯМР-спектроскопии.

Согласно методу Ленгмюра — Блджетта, пластинка, на которую следует нанести мультислой, неоднократно проводится через границу раздела фаз, на которую заранее нанесен монослой липида. Если пластинка гидрофильна, то полярные головки липида будут направлены к поверхности пластинки. Поскольку при каждом цикле проводки часть липида удаляется, необходима стабилизация ПД монослоя на желательном уровне путем уменьшения его

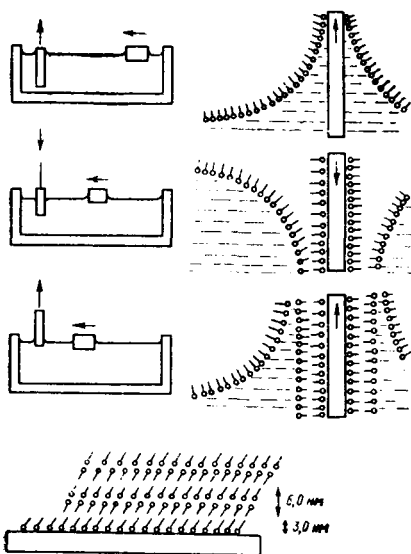


Рис. 92. Получение пленок Ленгмюра — Блоджетта на гидрофильной поверхности (объяснение см. в тексте)

площади (рис. 92). Автоматическое обеспечение скорости проводки дает хорошие результаты. При использовании пластинок с гидрофобными свойствами мультислой будут иметь обратную ориентацию молекул. Этот метод применяется также для получения монослоев с ориентированными трансмембранными белками.

Сборка ориентированных в монослоях молекул привлекают внимание исследователей в связи с проблемами микроэлектронной технологии. Очевидно, что для получения устойчивых структур необходимо после формирования мультислоев произвести их стабилизацию в области головок средней или хвостовой частей. Молекулярные цепи должны оканчиваться способной к полимеризации группой, гидрофильность которой ниже, чем у головки.

**Использование монослоев в методе пэтч-клампа.** Использование монослоев в методе пэтч-клампа имеет определенные преимущества, поскольку имеется экспериментальная возможность создавать бислои со строго ориентированными монослоями и включать в них определенные белки. Бислои оказываются высокостабильными.

### Примерное построение учебной задачи

Измерение поверхностного натяжения  $\gamma$  и молекулярной площади  $A$  исследуемого вещества производят с помощью кольцевой ванны Ленгмюра с круговым движением барьера. Ванну заполняют дистиллированной водой, на поверхность воды наслаивают вещество, содержащееся в соответствующем растворителе, оставляют до испарения растворителя и производят постепенное «поджатие» находящихся на поверхности воды молекул до образования сплошного мономолекулярного слоя. Величина ПД монослоя будет отличаться от величины ПД воды с незамкнутым монослоем. ПД измеряют с помощью пластинки Вильгельми, соединенной системой рычагов с механотроном, преобразующим механическую силу выталкивания пластинки в электрический сигнал, а также измеряющего микроамперметра и регистрирующего потенциометра (при использовании двухкоординатного потенциометра получают изотерму; рис. 93).

1. Проведение контрольных измерений для определения чистоты ванны.

В качестве примера, иллюстрирующего некоторые возможности монослойного метода, может служить измерение  $\gamma$  и  $A$  стеариновой кислоты и яичного лецитина.



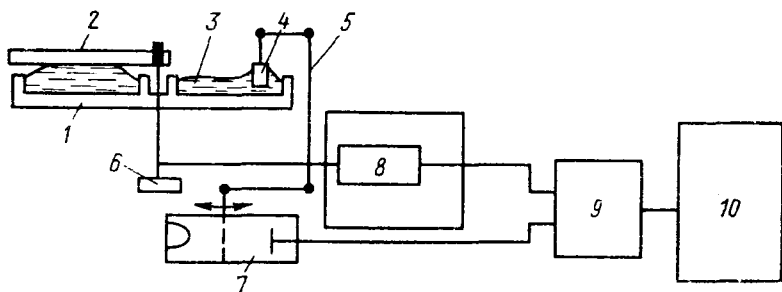


Рис. 93. Схема установки для получения изотерм монослоев:

1 — ванна Ленгмюра, 2 — барьер, приводимый в движение двигателем, 3 — дистиллированная вода с нанесенным на ее поверхность монослоем исследуемого вещества или смеси веществ, 4 — пластинка Вильгельми, 5 — система рычагов пластинки Вильгельми, 6 — реле остановки барьера, 7 — механотрон, 8 — двигатель барьера и коробка перемены передач, 9 — измерительный блок и источник питания, 10 — самопишущий двухкоординатный потенциометр

2. Определение молекулярной площади стеариновой кислоты. Приготавливают раствор стеариновой кислоты такой концентрации, чтобы при его нанесении в объеме 10 мкл сплошной монослой занимал около 25% полезной площади ванны (пример расчета приведен выше). Снимают изотермы стеариновой кислоты при трех скоростях смещения барьера:  $2 \text{ nm}^2 \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$ ;  $5 \text{ nm}^2 \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$  и при наименьшей, задаваемой коробкой перемены передач данной установки. Рассчитывают  $A$  стеариновой кислоты при указанных скоростях и строят график зависимости  $A$  от скорости смещения барьера.

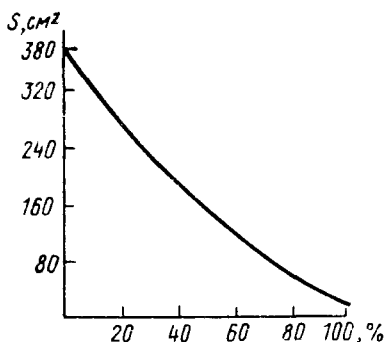
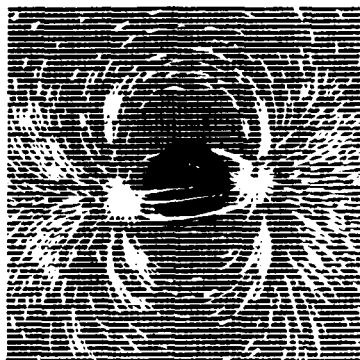


Рис. 94. Калибровочный график зависимости площади рабочей части ванны Ленгмюра ( $S$ ) от углового положения барьера, выраженного в процентах от полного углового смещения барьера

3. Определение молекулярной площади смеси стеариновой кислоты и яичного лецитина. Снимают изотермы смеси стеариновой кислоты и яичного лецитина при следующих весовых соотношениях компонентов:

Стеариновая кислота	0	20	40	60	80	100
Яичный лецитин	100	80	60	40	20	0

Строят диаграмму зависимости  $A$  от величины соотношения компонентов, делают вывод о взаимодействии компонентов в монослое. При расчетах  $A$  используют калибровочный график (рис. 94).



### § 1. Метод электронного парамагнитного резонанса

Явление *электронного парамагнитного резонанса* (ЭПР) было открыто советским физиком Е. К. Завойским в 1944 г.; это послужило основой для создания метода спектроскопии ЭПР, который широко используют при изучении структуры парамагнитных частиц и кинетики процессов с их участием. Парамагнитные вещества содержат *неспаренные электроны*.

Примерами парамагнитных частиц служат свободные радикалы, возникающие в ходе биохимических реакций, в результате повреждающего действия радиации на биологические объекты, в фотосинтетических системах при фотохимическом окислении хлорофилла. Свободные радикалы и ионы парамагнитных металлов являются наиболее распространенными в биологических системах парамагнитными частицами. Парамагнетизм ионов металлов переходной группы, таких, как Fe, Co, Ni, Cu, Mn, обусловлен особенностями заполнения электронных оболочек, в результате чего энергетически выгодным оказывается, когда на некоторых орбиталях находятся *неспаренные электроны*.

Метод ЭПР позволяет наблюдать окислительно-восстановительные превращения этих металлов и судить, таким образом, об их *функциональности*.

Возможности применения ЭПР в биологии не ограничиваются, однако, изучением только этих частиц. Методом ЭПР исследуют триплетные состояния, возникающие, например, в ходе фотобиологических реакций, так как молекулы в триплетном состоянии обладают двумя *неспаренными электронами*.

Большое распространение получил метод спиновых зондов и меток, когда в исследуемую систему (биомембрану или макромолекулу) вводят стабильные свободные радикалы, по характеристикам спектров ЭПР которых можно судить о структурно-динамическом состоянии самой системы.

**Магнетизм неспаренных электронов.** Применение ЭПР для изучения парамагнитных частиц связано с наличием *магнитных моментов* у неспаренных электронов. Магнитный момент обусловлен тем, что движение электрона как заряженной частицы представляет собой электрический ток, приводящий, в свою очередь, к появлению магнитного момента. Движению электрона по орбитали соответствует *орбитальный магнитный момент*, а спиновому движению электрона — *спиновый магнитный момент*.

Магнитный момент электрона связан с его механическим моментом. В качестве простейшего примера можно рассмотреть вращение электрона по орбите радиуса  $R$ .

Момент количества движения электрона  $P$  в этом случае равен

$$P = mvR, \quad (\text{VII.1.1})$$

где  $m$  — масса электрона,  $v$  — скорость.

С другой стороны, при движении электрона по такой орбите создается магнитный момент, подобный тому, который возникает при движении тока по контуру. Величина этого момента равна

$$\mu_m = IS, \quad (\text{VII.1.2})$$

где  $I$  — сила тока в контуре,  $S$  — площадь контура ( $S = \pi R^2$ ). Сила тока, создаваемого при движении электрона по круговой орбите, равна  $I = [v/(2\pi R)]e$ , где  $e$  — заряд электрона.

Подставляя эти значения в (VII. 1.2), получим

$$\mu_m = -vRe/2. \quad (\text{VII.1.3})$$

Если подставить в (VII. 1.3) значения  $P$  из (VII.1.1), получим  $\mu_m = -[e/(2m)] P$ .

Из теории атома известно, что величина орбитального магнитного момента связана с орбитальным квантовым числом следующим соотношением:

$$P_\varphi = n_\varphi \{h/(2\pi)\}. \quad (\text{VII.1.4})$$

С учетом (VII.1.4)

$$\mu_m = ---[eh/(4\pi m)] n_\varphi. \quad (\text{VII.1.5})$$

Величина магнитного момента  $\mu_m$  оказывается квантованной, поскольку  $n_\varphi$  принимает значения 0, 1, 2. Значения  $\mu_m$  могут быть вычислены для различных значений  $n_\varphi$ . Для  $n_\varphi = 1$  величина  $\mu_m = \beta = -[eh/(4\pi m)]$ , называемая *магнетон* Бора, выбрана в качестве единичного магнитного момента и равна  $9,27 \cdot 10^{-21}$  Дж/мТл.

Более точное рассмотрение движения электрона в атоме показывает, что механический момент электрона равен

$$P_l = [h/(2\pi)] \sqrt{l(l+1)},$$

где  $l$  — побочное квантовое число, принимающее значения 0, 1, 2, 3. Величина проекции орбитального магнитного момента на любое выделенное направление равна  $M_l [h/(2\pi)]$ , где  $M_l = 0, \dots, \pm l$ .

Спиновый магнитный момент электрона связан со спиновым движением электрона, которое можно представить как вращение электрона относительно собственной оси. Спиновый механический момент равен

$$P_s = [h/(2\pi)] \sqrt{S(S+1)},$$

где  $S = 1/2$  — спиновое квантовое число. Спиновому механическому моменту соответствует спиновый магнитный момент.

Магнитный и механический спиновые моменты связаны соотношением  $\mu_s = -P_s (e/m) = M_s [eh/(2\pi m)]$ , где  $M_s$  — магнитное квантовое число, равное  $\pm 1/2$ . Проекция магнитного момента на выделенное направление равна  $M_s [h/(2\pi)]$ .

Отношение магнитного момента к механическому называется *гиромагнитным отношением*  $j/\gamma$ . Легко видеть, что для орбитального движения  $\gamma = -[e/(2m)]$ , для спинового движения  $\gamma = - (e/m)$ .

Полный магнитный момент электрона равен векторной сумме орбитального и спинового магнитных моментов:  $\mu_j = \mu_e + \mu_s$ . Аналогично, полный механический момент электрона равен векторной сумме:  $P_j = P_e + P_s$ .

В силу неравенства гиромагнитных отношений для орбитального и спинового движений  $\mu_j/P_j \neq \mu_e/P_e \neq \mu_s/P_s$ .

Для отношения полных магнитного и механического моментов электрона вводят коэффициент пропорциональности  $g$  такой, что

$$\mu_j/P_j = -g [e/(2m)]. \quad (\text{VII.1.6})$$

Этот коэффициент, называемый *g-фактором*, равен единице при  $S = 0$ , т. е. в том случае, когда отсутствует спиновое движение электрона. Если орбитальный момент равен нулю ( $l = 0$ ), то  $g = 2$ .

Для систем, имеющих более одного неспаренного электрона, квантовые числа складываются, т. е.

$$S = \sum_i s_i; \quad L = \sum_i l_i; \quad J = L + S.$$

Величина  $g$ -фактора связана с полными квантовыми числами  $S, L, J$  следующим образом:

$$g = 1 + \frac{J(J+1) - L(L+1) + S(S+1)}{2J(J+1)}.$$

Магнитный момент неспаренного электрона складывается в общем случае из спинового и орбитального магнитных моментов. Однако в большинстве случаев орбитальный магнитный момент «погашен», поскольку орбитальное движение электрона существенно зависит от электрических полей, создаваемых окружением неспаренного электрона. Это приводит к тому, что орбитальный магнитный момент не вносит существенного вклада в общий магнитный момент электрона. Поэтому при обсуждении принципа ЭПР будет рассматриваться только спиновый магнитный момент.

Если для одного электрона магнитное спиновое число  $M_S$  может принимать два значения  $\pm 1/2$ , то для системы с двумя неспаренными электронами ( $S = 1$ )  $M_S$  принимает значения  $0, \pm 1$ . В общем случае разрешены значения  $M_S$ , находящиеся между  $(-S)$  и  $(+S)$ , т. е. всего  $2S + 1$  значений, различающихся на единицу.

**Принцип метода электронного парамагнитного резонанса.** Метод ЭПР основан на взаимодействии магнитных моментов неспаренных электронов с магнитным полем. Пусть в исследуемой системе находятся свободные радикалы, содержащие по неспаренному электрону. В отсутствие внешнего магнитного поля магнитные моменты неспаренных электронов ориентированы хаотически. При наложении внешнего магнитного поля магнитные моменты свободных радикалов будут ориентироваться в этом поле. Энергия взаимодействия магнитного момента неспаренного электрона с внешним магнитным полем определяется выражением  $E = -\mu H \cos(\mu, \mathbf{H})$ , где  $\mu$  — магнитный момент электрона,  $\mathbf{H}$  — напряженность поля,  $\cos(\mu, \mathbf{H})$  — косинус угла между векторами  $\mu$  и  $\mathbf{H}$ .

Однако во внешнем магнитном поле величина проекции магнитного момента на направление поля определяется разрешенными значениями магнитного квантового числа  $M_S$ , которое для одного неспаренного электрона может принимать значения  $\pm 1/2$ . Это означает, что магнитный момент неспаренного электрона может ориентироваться параллельно или антипараллельно по отношению к внешнему магнитному полю, т. е.  $\cos(\mu, \mathbf{H})$  может принимать значения  $\pm 0, -1$ . Величина энергии взаимодействия магнитного момента электрона с внешним магнитным полем равна  $\pm \mu H$ .

Из (VII.1.6) следует, что  $\mu_S/P_S = -g |e/(2m)|$ . Проекция механического момента  $P_S$  на выделенное направление (магнитное поле) принимает значение  $S \left(\frac{h}{2\pi}\right)$ . Отсюда проекция магнитного момента неспаренного электрона на направление внешнего магнитного поля равна  $\mu_z = -g\beta M_S$ . Для энергии взаимодействия магнитного момента неспаренного электрона с магнитным полем значения получаются  $\pm \mu_z H = g\beta H M_S = (\pm 1/2) g \beta H$ . Величина энергии оказывается квантованной.

Таким образом, во внешнем магнитном поле магнитные моменты неспаренных электронов ориентируются параллельно или антипа-

раллельно и каждой из ориентаций отвечает определенная энергия (рис. 95).

Расстояние между двумя энергетическими состояниями (уровнями)  $\Delta E = g\beta H$ .

Величина  $\Delta E$  зависит от напряженности внешнего поля. При  $H \approx 300$  мТл  $\Delta E \approx 4 \cdot 10^{-5}$  эВ, что при не очень низких температурах на несколько порядков меньше средней энергии теплового движения молекул.

В соответствии с законом Больцмана заселенности нижнего и верхнего уровней описываются выражением

$$n_2/n_1 = e^{-\Delta E/(kT)} = e^{-g\beta H/(kT)},$$

где  $n_2$  и  $n_1$  — заселенности верхнего и нижнего уровней. При обычных температурах заселенность нижнего уровня примерно на 0,2 % выше заселенности верхнего уровня. Если к системе, находящейся в магнитном поле, подвести высокочастотное излучение, то в ней начнут происходить переходы электронов между двумя состояниями. Однако, для того чтобы эти переходы возникли, необходимо соблюдение условия резонанса: энергия кванта подводимого излучения должна быть равна  $\Delta E$ , т. е.  $h\nu = \Delta E = g\beta H$ .

Под влиянием излучения электроны, находившиеся на нижнем уровне, будут поглощать энергию высокочастотного излучения и переходить на верхний уровень, а электроны, находившиеся на верхнем уровне, испустив квант энергии, перейдут на нижний уровень. Вероятности одиночного перехода из нижнего состояния в верхнее и наоборот равны. Заселенность нижнего состояния выше, чем заселенность верхнего состояния. В силу этого количество переходов снизу вверх больше числа переходов сверху вниз. Так как

переходы из нижнего состояния в верхнее сопровождаются поглощением энергии, то в условиях резонанса наблюдается поглощение энергии в парамагнитном образце на частоте  $\nu$ :

$$\nu = g\beta H/h.$$

В настоящее время для изучения свободных радикалов чаще всего применяются спектрометры, где величина  $H$  равна 300—350 мТл, частота  $\nu$  составляет примерно  $10^{10}$  Гц, длина волны  $\lambda \approx 3$  см, т. е. излучение относится к радиодиапазону сверхвысоких частот (СВЧ). Таким образом, метод ЭПР является одним из методов радиоспектроскопии. Резонансное поглощение можно наблюдать изменяя частоту  $\nu$  электромагнитного излуче-

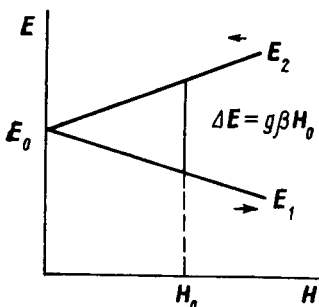


Рис. 95. Расщепление энергетических уровней неспаренного электрона в магнитном поле

Стрелками показаны ориентации магнитных моментов неспаренных электронов относительно внешнего магнитного поля

ния при постоянстве напряженности магнитного поля  $H$  или напряженность  $H$  при постоянстве  $\nu$ .

Из практических соображений применяют второй способ регистрации резонансного поглощения. В простейшем виде резонансное поглощение представляет собой узкую одиночную линию (рис. 96), хотя в действительности резонансное поглощение представляет более сложную кривую зависимости поглощения радиочастотного излучения от напряженности поля. Это связано с тем, что магнитный момент неспаренного электрона взаимодействует не только с внешним магнитным полем, но и с внутренними полями, источниками которых являются соседние неспаренные электроны, ряд ядер, обладающих магнитными моментами.

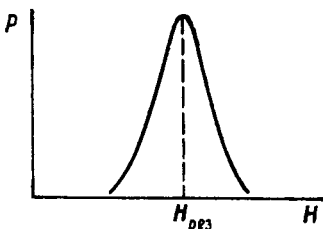


Рис. 96. Одиночная линия поглощения ЭПР

**Принцип построения спектрометров ЭПР.** Спектрометр ЭПР состоит из магнита, создающего стабильное магнитное поле, которое можно плавно изменять в требуемом диапазоне напряженностей; источника радиочастотного излучения; системы, позволяющей подвести радиочастотное излучение к образцу и зарегистрировать резонансное поглощение; системы усиления и обработки сигнала (рис. 97).

В качестве источников постоянного магнитного поля применяют электромагниты. Для того чтобы сигналы ЭПР регистрировались без искажений, необходимо, чтобы магнитное поле было однородным и стабильным. Этого достигают применением стабилизированных источников питания и точной установкой полюсных наконечников магнита. Помимо этого, в спектрометрах ЭПР содержатся схемы, позволяющие проводить линейное и плавное изменение напряженности поля с заданной скоростью и в заданном диапазоне. Напряженность поля измеряют с помощью специальных магнитометров. Источниками радиочастотного излучения служат специальные генераторные лампы — клистроны.

Широкое распространение получили спектрометры, работающие на длине волны 3 см ( $\nu \approx 10^{10}$  Гц), — спектрометры X-диапазона. Применяют также спектрометры Q-диапазона ( $\lambda \approx 8$  мм,  $\nu \approx 2,4 \cdot 10^{10}$  Гц). Реже применяют спектрометры, использующие излучения и с другими длинами волн, например 2 мм, 4 мм, 1,25 см.

Частота генерации клистрона поддерживается постоянной с помощью системы автоподстройки частоты (АПЧ). Питание клистронов осуществляется от стабилизированных источников, с тем чтобы избежать изменений частоты и мощности генерируемого излучения.

Для передачи СВЧ-излучения к образцу используют волноводы — металлические трубки определенного сечения, являющиеся анало-

гами высокочастотных кабелей. Совокупность волноводов называется волноводным или СВЧ-трактом спектрометра.

Помимо волноводов как таковых в волноводный тракт спектрометра входит ряд элементов. Один из них — *резонатор*. Он расположен между полюсными наконечниками электромагнита, и именно в нем помещен образец. Резонаторы являются аналогами колебательных контуров, которые накапливают энергию подводимых к ним

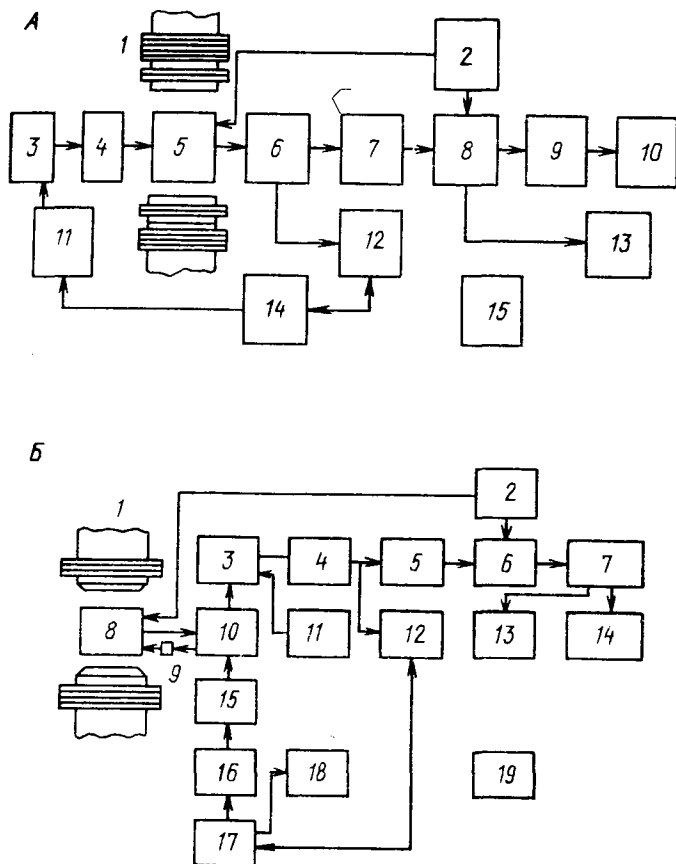


Рис. 97. Схема радиоспектрометра ЭПР с проходным (А) и отражательным (Б) резонаторами:

А: 1 — магнит, 2 — модулятор, 3 — аттенуатор, 4 — согласователь, 5 — рабочий резонатор, 6 — СВЧ-детектор, 7 — резонансный усилитель, 8 — синхронный детектор, 9 — усилитель постоянного тока, 10 — самописец, 11 — ферритовый вентиль, 12 — система АПЧ, 13 — осциллограф, 14 — клистрон, 15 — блок питания; Б: 1 — магнит, 2 — модулятор, 3 — детекторная секция, 4 — предусилитель, 5 — резонансный усилитель, 6 — синхронный детектор, 7 — усилитель постоянного тока, 8 — резонатор, 9 — согласователь, 10 — циркулятор, 11 — фазовращатель, 12 — система АПЧ, 13 — осциллограф, 14 — самописец, 15 — аттенуатор, 16 — ферритовый вентиль, 17 — клистрон, 18 — ферритовый вентиль, 19 — блок питания



колебаний, если частота колебаний соответствует резонансной частоте контура. Назначение резонатора состоит в концентрировании на образце энергии СВЧ-излучения, приходящего от клистрона по волноводам. Объемные резонаторы, используемые в ЭПР-спектрометрах, различаются по конструкции. Чаще всего применяют цилиндрические или прямоугольные резонаторы. В цилиндрических резонаторах напряженность магнитной составляющей СВЧ-волны максимальна в центре резонатора; в прямоугольных — область максимальной напряженности магнитной составляющей представляет собой плоскость, проходящую через центр резонатора. Исследуемый образец помещают в резонатор радиоспектрометра таким образом, чтобы он находился в области максимальной напряженности магнитной составляющей. По этой причине в цилиндрические резонаторы образцы помещают обычно в тонких капиллярах, а в прямоугольных — используют плоские кюветы.

Биологические образцы, как правило, содержат много воды, молекулы которой обладают большой величиной электрического дипольного момента. Электрический дипольный момент воды взаимодействует с электрической составляющей СВЧ-волны. Это приводит к сильному нерезонансному поглощению СВЧ-излучения и снижению чувствительности спектрометра. Чтобы избежать этого явления, в резонатор помещают образец так, чтобы последний находился точно в области максимума магнитной составляющей, поскольку напряженность электрической составляющей СВЧ-волны в этом месте равна нулю. По этой причине при работе с водными образцами предпочтительнее использовать прямоугольные резонаторы и плоские тонкие кюветы (внутренний зазор кюветы приблизительно 0,2 мм).

Помимо резонатора в волноводный тракт спектрометра включают и другие элементы, служащие для настройки СВЧ-тракта, подбора оптимальных условий для регистрации сигнала.

*Аттенюатор* — устройство, позволяющее изменять мощность СВЧ-излучения, падающего на образец. *Вентили* — элементы, пропускающие СВЧ-излучение только в одном направлении. Существуют элементы, позволяющие изменять фазу колебаний СВЧ-излучения, — *фазовращатели*. Согласователи, являющиеся аналогом переменной емкости и индуктивности, служат для подбора оптимальной связи резонатора с СВЧ-трактом. Существует и ряд других элементов, принципы устройства и работы которых изложены в специальной литературе.

Регистрацию резонансного поглощения радиочастотного излучения в образце производят с помощью кристаллического детектора, помещенного в специальной детекторной секции, которая также является одним из элементов волноводного тракта. В качестве детекторов используют специальные полупроводниковые диоды. Сигнал с детектора поступает в систему усиления и обработки сигнала. Обычно сигнал ЭПР можно наблюдать на осциллографе или регистриро-

вать на ленте самописца. В современных спектрометрах широко применяют компьютеры, позволяющие хранить информацию в памяти ЭВМ и обрабатывать сигналы ЭПР по определенным программам. Использование компьютеров существенно расширяет возможности ЭПР-спектрометров. Например, с помощью компьютера можно повысить чувствительность спектрометра, применяя так называемое *накопление сигналов*. Использование компьютеров значительно улучшает временное разрешение при регистрации кинетики сигналов ЭПР; кроме того, компьютеры по заданным программам управляют работой спектрометра.

Для получения сигнала ЭПР, нужно в некоторых пределах произвести изменение величины магнитного поля  $H$ , т. е. осуществить развертку поля. Обычно развертка поля осуществляется в течение десятков секунд или нескольких минут. Это означает, что ток, протекающий через кристаллический детектор, будет изменяться из-за резонансного поглощения СВЧ-излучения в образце в течение этого же времени, т. е. регистрация сигнала ЭПР будет идти на низкой частоте. Однако на низкой частоте СВЧ-детекторы обладают большим собственным шумом и, следовательно, выгоднее проводить регистрацию сигнала на более высоких частотах. Для этой цели служит высокочастотная модуляция магнитного поля (рис. 98).

Пусть магнитное поле  $H$  медленно меняется в пределах от  $H_{\min}$  до  $H_{\max}$  и величина поля  $H$  в данный момент соответствует некоторому значению  $H_n$ . Наложим на медленно изменяющееся поле  $H$  дополнительное модулирующее поле  $H_{\text{мод}}$ . Тогда по отношению к точке  $H_n$  ток на детекторе будет изменяться от значения  $i_1$  до  $i_2$  (в отсутствие модулирующего поля значение тока соответствовало бы некоторой величине  $i_n$ ). Следовательно, на вход усилителя с детектора будет поступать переменный сигнал с частотой, равной час-

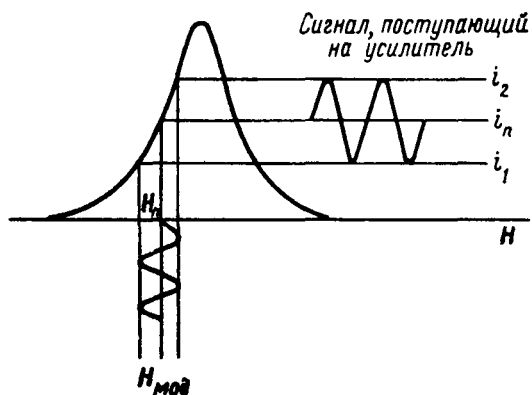


Рис. 98. Принцип высокочастотной модуляции магнитного поля (объяснение см. в тексте)

тоте модулирующего поля, и амплитудой, определяемой значениями тока  $i_1$  и  $i_2$ .

Амплитуда переменного сигнала определяется крутизной сигнала ЭПР в точке  $H_n$ , т. е. пропорциональна производной сигнала ЭПР при данном значении постоянного магнитного поля  $H_n$ . Подобные рассуждения приложимы к любому значению магнитного поля  $H$ , лежащего в пределах  $H_{\min}$  и  $H_{\max}$ . Это означает, что при изменении величины поля  $H$  получают на выходе не интегральный сигнал ЭПР, а его первую производную (рис. 99). Как видно из рис. 99, значение производной равно нулю в точке максимума резонансного сигнала и достигает экстремальных значений в точках максимального наклона интегральной кривой.

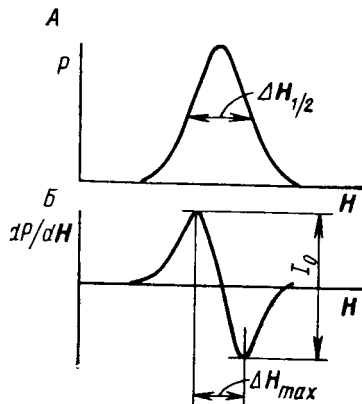


Рис. 99. Линия поглощения (А) и ее первая производная (Б)

Применение высокочастотной модуляции магнитного поля дает возможность регистрировать сигнал ЭПР на более высоких частотах, соответствующих частоте модуляции. Это позволяет применять для усиления сигналов узкополосные резонансные усилители и уменьшать тем самым полосу шумов.

Технически высокочастотную модуляцию поля осуществляют с помощью специальных генераторов. Наиболее распространены в настоящее время спектрометры, где применяется высокочастотная модуляция поля с частотой 100 кГц. Использование высокочастотной модуляции поля позволяет включить в схему регистрации сигнала ЭПР так называемый фазочувствительный, или синхронный, детектор.

Таким образом, в спектрометрах ЭПР сигнал регистрируется в виде первой производной.

Спектрометры ЭПР различают по типу построения их волноводных трактов. В спектрометрах с проходным резонатором волноводный тракт построен таким образом, что СВЧ-излучение проходит от клистрона чрез резонатор и далее на детектор. В момент резонанса образец поглощает СВЧ-излучение, что и регистрируется как уменьшение мощности СВЧ, приходящего на детектор.

В спектрометрах с отражательным резонатором волноводный тракт построен по типу мостовой схемы и сигнал ЭПР регистрируется как сигнал рассогласования моста в момент резонанса. В этот момент часть мощности отражается от резонатора и поступает на детектор. В настоящее время отражательные спектрометры применяют чаще, поскольку отражательный волноводный тракт позво-

ляет эффективно уменьшать шумы клистрона и подбирать наиболее оптимальный режим работы детектора СВЧ.

**Характеристика спектров ЭПР.** Основными параметрами, характеризующими спектры ЭПР, служат интенсивность линии поглощения, ширина и форма линии, величина  $g$ -фактора, наличие сверхтонкой структуры (СТС) спектра ЭПР.

Интенсивность линии поглощения прямо связана с концентрацией парамагнитных частиц в образце: площадь под кривой поглощения  $S$  пропорциональна концентрации неспаренных электронов  $N$ :  $S = kN$ . Обычно для определения концентрации используют сравнение сигналов ЭПР исследуемого образца и эталона с известным количеством парамагнитных частиц. Сопоставляя площади под интегральными кривыми исследуемого  $S_x$  и эталонного  $S_0$  образцов, определяют количество парамагнитных частиц в исследуемом образце:

$$N_x = N_0 (S_x/S_0).$$

Так как в реальных спектрометрах сигнал регистрируется в виде первой производной, то для нахождения  $S$  проводят двойное интегрирование сигнала.

**Ширина и форма линии.** Ширина сигнала ЭПР определяется взаимодействием магнитных моментов электронов с окружением (*спин-решеточное взаимодействие*). Воздействие высокочастотного электромагнитного поля индуцирует переходы в системе спинов.

Пусть в состоянии с более низкой энергией находится  $N_1$  электронов, а в состоянии с более высокой —  $N_2$ . При поглощении электромагнитного излучения заселенности верхнего и нижнего уровней будут изменяться. Изменения заселенности этих состояний со временем можно описать уравнениями

$$dN_1/dt = N_2 W_{21} - N_1 W_{12},$$

где  $W_{12}$  и  $W_{21}$  — вероятности переходов снизу вверх и сверху вниз соответственно.

Аналогично можно записать, что  $dN_2/dt = N_1 W_{12} - N_2 W_{21}$ . Вероятности переходов  $W_{12}$  и  $W_{21}$  равны:  $W_{12} = W_{21} = W$ . Если ввести переменную  $n = N_1 - N_2$  — разность заселенности двух уровней, тогда

$$dn/dt = (dN_1/dt) - (dN_2/dt) = -W(2N_1 - 2N_2) = -2Wn.$$

Решение этого уравнения имеет вид  $n = n_0 e^{-2Wt}$ , где  $n_0$  — разность заселенностей при  $t = 0$ . Из этого выражения видно, что со временем (при  $t \rightarrow \infty$ ) разность заселенностей стремится к нулю. Это означает, что сигнал ЭПР в конце концов перестанет наблюдаться, что, однако, противоречит опыту. Следовательно, нужно предположить, что существует механизм, постоянно поддерживающий разность заселенностей. Таким механизмом и является процесс обмена энергией между системой спинов и решеткой — средой, в которой находятся парамагнитные частицы.

В результате такого спин-решеточного взаимодействия энергия системы спинов переходит в энергию тепловых колебаний решетки или в энергию связей парамагнитной частицы, система спинов теряет энергию, т. е. «остывает», в то время как окружающая решетка «нагревается». Таким образом, спин-решеточное взаимодействие приводит к уравниванию температур системы спинов и решетки.

Если обозначить вероятности индуцируемых решеткой переходов в системе спинов  $P_{12}$  и  $P_{21}$ , то в случае спин-решеточного взаимодействия эти вероятности не будут равны:  $P_{21} > P_{12}$ . Только при соблюдении этого условия будет сохраняться разность заселенностей.

Для изменения заселенности каждого уровня только за счет спин-решеточного взаимодействия и при отсутствии высокочастотного поля можно записать, что

$$\begin{aligned} dN_1/dt &= N_2 P_{21} - N_1 P_{12}; & dN_2/dt &= N_1 P_{12} - N_2 P_{21}; \\ dn/dt &= -2(N_1 P_{12} - N_2 P_{21}). \end{aligned} \quad (\text{VII.1.1})$$

Общее количество неспаренных электронов  $N = N_1 + N_2$ . Поскольку  $n = N_1 - N_2$ , можно записать:  $N_1 = (1/2)(N + n)$  и  $N_2 = (1/2)(N - n)$ . При подстановке в уравнение (VII.1.1) получается

$$dn/dt = N(P_{21} - P_{12}) - n(P_{12} + P_{21}).$$

В стационарном состоянии  $dn/dt = 0$ , откуда

$$n_0 = N \left( \frac{P_{21} - P_{12}}{P_{12} + P_{21}} \right).$$

С учетом этого

$$dn/dt = (n_0 - n)(P_{12} + P_{21}) \quad \text{или} \quad dn/dt = (n_0 - n)/T_1,$$

$$\text{где } T_1 = 1/(P_{12} + P_{21}).$$

Величина  $T_1$ , обозначенная таким образом, характеризует скорость установления равновесного значения  $n$  и называется *временем спин-решеточной релаксации*.

Если система облучается высокочастотным излучением, то с учетом переходов, индуцированных излучением, полная скорость изменения разностей населенностей будет

$$dn/dt = -2Wn + (n_0 - n)/T_1.$$

В стационарном состоянии  $n = \dot{n}_0/1 + 2WT_1$ . Из этого выражения видно, что при  $2WT_1 \ll 1$   $n = n_0$ . Известно, что  $W$  пропорциональна квадрату амплитуды высокочастотного поля. Из этого следует, что при малой мощности излучения равновесная населенность уровней практически не нарушается.  $T_1$  как величина, обратная сумме вероятностей, характеризует среднее время жизни данного спинового состояния. Тем самым величина  $T_1$  определяет естественную ширину линии ЭПР.

Как следует из соотношения неопределенностей Гейзенберга для энергии и времени,

$$\delta E \Delta t \geq h/(2\pi).$$

Если в качестве  $\Delta t$  принять  $T_1$ , то  $\delta E \geq h/(2\pi T_1)$ .  $\delta E$  характеризует «размазанность» значений энергии уровней  $E_1$  и  $E_2$  (см. рис. 95). При уменьшении  $T_1$  значение  $\delta E$  увеличивается и уровни энергии размываются. В этом случае наблюдаются и более широкие линии ЭПР. Поскольку энергия взаимодействия магнитного момента неспаренного электрона с внешним полем равна  $E = \pm (1/2) g\beta H$ , то неопределенность в разности энергии  $\delta E = g\beta \Delta H$ . Выразив  $\delta E$  таким образом, получим, что  $\Delta H \geq h/(2\pi T_1 g\beta)$ . Легко заметить, что при уменьшении  $T_1$   $\Delta H$  возрастает.

Как показано на рис. 96, сигнал поглощения регистрируют, изменяя в некоторых пределах напряженность магнитного поля вблизи точки  $H_0 = H_{\text{рез}}$ . В этом случае сигнал ЭПР представляется некоторой функцией от напряженности внешнего поля  $f(H)$ ; эта функция называется *функцией формы линии*.

В разбавленных растворах парамагнитных частиц, когда можно пренебречь взаимодействием между отдельными частицами, сигналы ЭПР для всех частиц наблюдаются при одних и тех же значениях внешнего магнитного поля. В этом случае кривая поглощения описывается функцией Лоренца:

$$I_L = I_0 \left( 1 + 4 \frac{(H - H_0)^2}{\Delta H_{1/2}^2} \right)^{-1} \text{ для интегральной кривой}$$

$$\text{или } I'_L = -I'_0 \frac{16(H - H_0)}{9\Delta H_{\text{max}}} \left[ 1 + \frac{4}{3} \frac{(H - H_0)^2}{\Delta H_{\text{max}}^2} \right] \text{ для первой производной,}$$

где  $I_0$  и  $I'_0$  — амплитуды интегральной кривой и сигнала, зарегистрированного в виде первой производной;  $\Delta H_{1/2}$  — ширина на половине высоты для интегрального сигнала;  $\Delta H_{\text{max}}$  — ширина между точками максимального наклона для первой производной (см. рис. 99).

Чаше, однако, сигналы ЭПР описываются гауссовой формой линии. В этом случае сигнал ЭПР представляет собой огибающую сдвинутых друг относительно друга сигналов от отдельных групп парамагнитных частиц (спин-пакетов). Гауссова форма линии описывается следующим образом:

$$I_G = I_0 e^{-\frac{(H - H_0)^2}{0,36\Delta H_{1/2}^2}} \text{ для интегрального сигнала;}$$

$$I'_G = -I'_0 V e^{-\frac{(H - H_0)^2}{\Delta H_{\text{max}}^2}} \text{ для первой производной.}$$

Учет формы линии важен при расчетах концентрации парамагнитных частиц. Лоренцевская линия по сравнению с гауссовой имеет более длинные крылья, что необходимо учитывать при вычислении площади под кривой поглощения.

Спин-решеточное взаимодействие является одним из факторов, определяющих ширину линии. Естественная ширина линии обратно пропорциональна времени  $T_1$ , и при малых  $T_1$  именно спин-решеточная релаксация определяет ширину линии, что характерно, например, для сигналов ЭПР парамагнитных ионов. Так,  $T_1$ , равному  $10^{-9}$  с, соответствует ширина линии порядка 6 мТл. При более коротких временах  $T_1$  сигналы ЭПР парамагнитных ионов иногда уширяются настолько, что становятся не наблюдаемыми при комнатной температуре. Для свободных радикалов характерны большие времена спин-решеточной релаксации порядка  $10^{-4}$  —  $10^{-5}$  с, поэтому следовало ожидать, что соответствующий сигнал ЭПР должен быть достаточно узким ( $\sim 10^{-4}$  мТл). Однако в экспериментах наблюдаются более широкие сигналы.

В этом случае вводят еще одно время релаксации  $T_2$  — *время спин-спиновой релаксации*. Время  $T_2$ , так же как  $T_1$ , определяет ширину сигнала ЭПР и связано с временем  $T_1$  следующим образом:  $1/T_{\text{набл}} = 1/(2T_1) + 1/T_2$ , где  $T_{\text{набл}}$  — суммарное время релаксации.

Ширина линии связана с  $T_{\text{набл}}$ :  $\Delta H = [h/(2\pi g\beta)] (1/T_{\text{набл}})$ . Спин-спиновая релаксация — процесс обмена энергией внутри системы спинов. Обмен энергией между отдельными неспаренными электронами не изменяет энергии системы спинов в целом. Однако спин-спиновые взаимодействия приводят к изменению времени жизни данного спинового состояния. Время  $T_2$ , таким образом, также будет определять ширину линии.

Для свободных радикалов в растворах  $T_1 \gg T_2$ , поэтому ширина линии определяется именно временем  $T_2$ . Время  $T_2$  зависит от целого ряда процессов, которые приводят к уширению сигналов ЭПР. Ряд механизмов уширения линий рассматривается ниже.

*Диполь-дипольное взаимодействие.* Диполь-дипольное взаимодействие — основной механизм уширения линий в твердых телах. Суть этого эффекта заключается в том, что каждый неспаренный электрон является источником локального магнитного поля, напряженность которого на расстоянии  $R$  равна  $H_{\text{лок}} = \pm \mu/R^3$ , где  $\mu$  — магнитный момент электрона. Соседние парамагнитные частицы испытывают влияние этого поля. В результате происходит изменение напряженности эффективного магнитного поля для разных частиц и уширение сигналов ЭПР на величину  $\Delta\nu_0 = g\beta H_{\text{лок}}/h$ .

Локальное магнитное поле зависит и от ориентации пары взаимодействующих парамагнитных частиц относительно внешнего магнитного поля:  $H_{\text{лок}} = (\mu/R^3) (3 \cos^2 \theta - 1)$  (рис. 100). При изменении  $R$  и  $\theta$  для различных пар частиц наблюдаемый сигнал является огибающей более узких индивидуальных линий.

Диполь-дипольное уширение линий зависит от концентрации парамагнитных частиц в образце:  $\Delta H_{\text{дип}} = Kc$ , где  $K$  — константа,  $c$  — концентрация частиц.

В растворах низкой вязкости диполь-дипольное взаимодействие усредняется до нуля за счет быстрой переориентации парамагнитных частиц.

**Анизотропия  $g$ -фактора.** Еще одним источником уширения линий является анизотропия  $g$ -фактора. Значение  $g$ -фактора, как отмечалось вначале, очень часто близко к спиновому значению, равному для свободного электрона 2,0023. Это происходит потому, что орбитальный магнитный момент практически не вносит вклада в общий магнитный момент электрона. Однако, в особенности для ионов металлов, наблюдаются отклонения величины  $g$ -фактора от чисто спинового значения. Это свидетельствует о том, что орбитальное движение электрона создает добавочный орбитальный магнитный момент, складывающийся со спиновым магнитным моментом. Орбитальное движение электрона создает переменное магнитное поле, с которым взаимодействует спиновый магнитный момент. Такое взаимодействие называется *спин-орбитальным взаимодействием* и характеризуется константой *спин-орбитального взаимодействия*  $\lambda$ , которая возрастает с увеличением атомного номера элемента. Зависимость  $g$ -фактора от константы спин-орбитальной связи имеет вид  $g = 2,0023 [2 - f(\lambda/\Delta)]$ , где  $\Delta$  — величина расщепления между основным и более высоким орбитальным состояниями атома.

Таким образом, добавочный орбитальный магнитный момент приводит к отклонению  $g$ -фактора от значения 2,0023, что определяется не только факторами  $\lambda$  и  $\Delta$ , но и зависит от влияния электрического поля, создаваемого соседними атомами.

Кристаллическое или молекулярное электрическое поле, влияя на орбитальное движение электрона, определенным образом ориентуют магнитный момент электрона относительно внутреннего поля частицы.

Конкуренция между внешним магнитным полем и внутренним кристаллическим полем приводит к анизотропии  $g$ -фактора. В свою очередь, анизотропия  $g$ -фактора приводит и к уширению суммарного сигнала ЭПР, наблюдающегося для ансамбля парамагнитных частиц. Значения  $g$ -фактора по трем осям системы координат, связанной с частицей, обозначают как  $g_{xx}$ ,  $g_{yy}$ ,  $g_{zz}$ . Эти значения можно определить для монокристаллов, определенным образом ориентируя их во внешнем магнит-

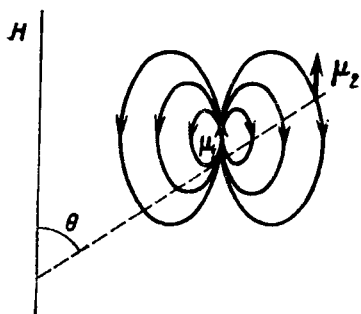


Рис. 100. Схема диполь-дипольного взаимодействия двух магнитных моментов:

$\mu_1$  и  $\mu_2$  — магнитные моменты неспаренных электронов



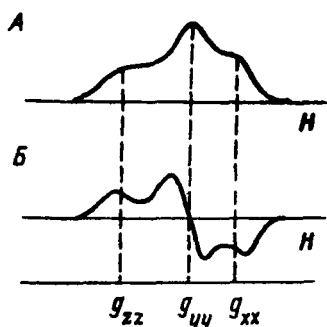


Рис. 101. Линия поглощения (А) и ее первая производная (Б) при анизотропии  $g$ -фактора

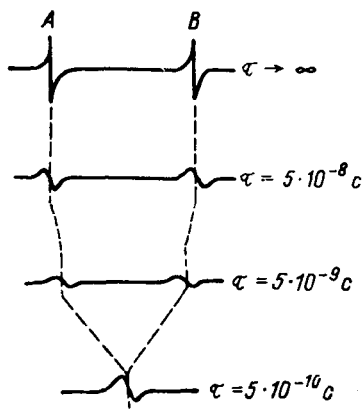


Рис. 102. Сигнал ЭПР при различных скоростях взаимного превращения двух форм (А и В) свободного радикала (остальные объяснения см. в тексте)

ном поле. Значения  $g_{xx}$ ,  $g_{yy}$ ,  $g_{zz}$  для поликристаллических образцов определяют по характерным точкам спектра ЭПР (рис. 101).

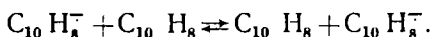
В растворах анизотропия  $g$ -фактора частично усредняется вследствие интенсивного движения молекул, что вызывает некоторое сужение линии ЭПР-поглощения по сравнению с твердыми образцами. Однако для больших молекул анизотропия  $g$ -фактора может наблюдаться и в растворе.

*Динамические механизмы уширения линий.* Уширение линий в результате диполь-дипольных взаимодействий и анизотропии  $g$ -фактора наблюдается в основном в твердых телах. В жидкостях проявляется еще целый ряд эффектов, имеющих динамический характер и приводящих к уширению линий.

Так, в растворах часто наблюдается уширение линий, связанное с протекающими в системе химическими реакциями. Пусть исследуемая система содержит радикал, который существует в двух различных формах А и В, обладающих собственным сигналом ЭПР. При малой скорости взаимного превращения этих двух форм радикала в суммарном спектре будут наблюдаться две линии, отвечающие формам А и В (рис. 102). Увеличение скорости взаимного превращения будет приводить к уширению линий, поскольку при этом уменьшается время жизни радикала в данной форме. Зависимость ширины линии от времени выражается соотношением  $\Delta N_{\text{набл}} = \Delta N_0 + [1/(2\tau c)]$ , где  $\Delta N_{\text{набл}}$  и  $\Delta N_0$  — наблюдаемая ширина линии и ширина линии в отсутствие обмена,  $\tau$  — среднее время жизни радикала в форме А или В.

При увеличении скорости взаимных превращений линии, уширяясь, начинают дополнительно сближаться и сливаются. Это происходит по той причине, что при высокой скорости взаимных превращений невозможно различить сигналы радикала в отдельных состояниях *A* и *B*. В спектре ЭПР наблюдается только одна линия при усредненном по времени значении резонансного поля.

Одним из достоинств метода ЭПР при изучении химических процессов является возможность наблюдать взаимодействия химически идентичных частиц. Примером такой реакции может служить перенос электрона между анион-радикалом и нейтральной молекулой нафталина:



Наблюдаемое уширение линий в спектре анион-радикала связано с уменьшением времени жизни электрона при переносе электрона между радикалом и нейтральной молекулой.

Еще одной причиной уширения линий является *электронный спиновый обмен*: сталкиваясь, радикалы могут обмениваться своими спиновыми состояниями. Так, если до столкновения в первом радикале магнитный момент неспаренного электрона был ориентирован по полю, а во втором — против поля, то после столкновения ориентации магнитных моментов неспаренных электронов у каждого из радикалов меняются на противоположные. Такой процесс приводит к уменьшению жизни неспаренного электрона в данном спиновом состоянии, что и вызывает уширение линий.

Скорость спинового обмена возрастает с увеличением концентрации радикала, в силу чего с увеличением концентрации изменяется и ширина линии:  $\Delta H = Kc$ .

Уширение, обусловленное спиновым обменом, наблюдается не только при взаимодействии радикалов друг с другом, но и при взаимодействии радикалов с другими парамагнетиками. Например, хорошо известно, что молекулярный кислород, являясь парамагнетиком, вызывает дополнительное уширение линий, что приводит к смазыванию структуры сигнала.

К уширению сигналов ЭПР свободных радикалов приводит присутствие в системе парамагнитных ионов металлов. К уширению линий может приводить еще ряд динамических процессов, например зависящее от времени взаимодействие магнитных моментов электронов с магнитными моментами ядер, протонный обмен с растворителем и другое. Все эти процессы вносят вклад в величину обсуждавшегося выше времени  $T_2$ , приводя к уширению линий в спектрах ЭПР.

**Сверхтонкая структура спектров ЭПР.** При обсуждении принципа ЭПР было показано, что на неспаренный электрон действует эффективное магнитное поле, являющееся суммой внешнего магнитного поля и внутреннего локального поля. Одним из источников внутренних локальных полей служат ядра многих элемен-

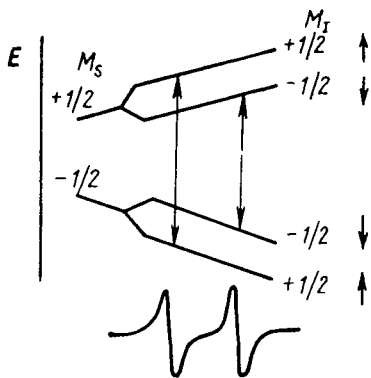


Рис. 103. Сверхтонкое взаимодействие магнитного момента неспаренного электрона с протоном ( $I = 1/2$ )

Длинными стрелками показаны переходы между уровнями; мелкими — ориентация магнитного момента протона относительно внешнего поля

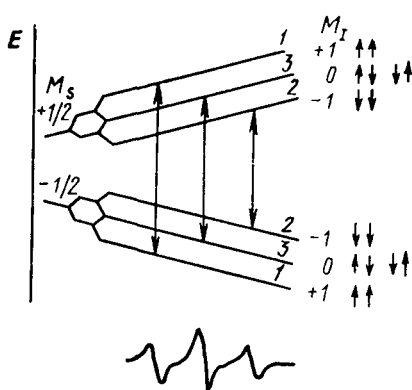


Рис. 104. Сверхтонкое взаимодействие магнитного момента неспаренного электрона с двумя эквивалентными протонами

Длинными стрелками показаны переходы между уровнями; мелкими — ориентация магнитных моментов протонов относительно внешнего поля

тов. Например, протоны, ядра дейтерия, азота  $N^{14}$ , углерода  $C^{13}$  и др. Взаимодействие магнитных моментов неспаренных электронов с магнитными моментами ядер — *сверхтонкое взаимодействие* — приводит к расщеплению линий и появлению сверхтонкой структуры в спектрах ЭПР.

Рассмотрим в качестве примера радикал, в котором неспаренный электрон взаимодействует с одним протоном. Неспаренный электрон находится в суммарном магнитном поле: внешнем и создаваемом протоном. При рассмотрении спектра ЭПР такого радикала необходимо учитывать тот факт, что магнитный момент протона также ориентируется во внешнем магнитном поле. Ядерный спин протона равен  $I = 1/2$ . Это означает, что магнитное квантовое число  $M_I$  протона имеет значения  $\pm 1/2$ , а значит, магнитный момент протона может быть ориентирован параллельно или антипараллельно по отношению к внешнему магнитному полю. Это приводит к тому, что для одних радикалов  $H_{эфф} = H + H_{лок}$ , а для других  $H_{эфф} = H_0 - H_{лок}$ . В силу этого в спектре ЭПР рассматриваемого радикала будут наблюдаться две линии (рис. 103) при двух значениях внешнего магнитного поля:  $H_{рез} = H_0 \pm a/2 = H_0 - aM_I$ , где  $a$  — константа сверхтонкого расщепления, равная расстоянию между двумя линиями СТС;  $H_0$  — резонансное поле при  $a = 0$ , т.е. при отсутствии сверхтонкого взаимодействия.

Схема энергетических уровней неспаренного электрона, взаимодействующего с одним протоном, показана на рис. 103. Локальное поле, создаваемое протоном, расщепляет каждый из исходных уров-

ней на два. Обозначенные переходы происходят при условии, что  $\Delta M_S = 1$ ,  $\Delta M_I = 0$ , где  $\Delta$  означает изменение соответствующего квантового магнитного числа.

Если неспаренный электрон взаимодействует более чем с одним протоном, то картина СТС усложняется. Например, при взаимодействии с двумя эквивалентными протонами (неспаренный электрон взаимодействует с ними в одинаковой степени) в спектре ЭПР будут наблюдаться три линии (рис. 104). Действительно, магнитные моменты двух протонов могут быть ориентированы относительно внешнего поля тремя способами: оба по полю (состояние 1), оба против поля (состояние 2) и один по полю, другой против поля (состояние 3).

Состояния 1 и 2, когда оба магнитных момента ориентированы по полю или против поля, как видно из рис. 104, могут быть реализованы только одним способом. В то же время состояние 3, когда один из магнитных моментов ориентирован по полю, а другой — против поля, реализуется двумя способами. Это означает, что число радикалов в состоянии 3 вдвое больше числа радикалов состояниях 1 и 2. В силу этого обсуждаемый спектр состоит из трех линий с соотношением интенсивностей 1:2:1.

При увеличении числа протонов, с которыми может взаимодействовать неспаренный электрон, спектр будет содержать еще больше линий. Например, в случае трех эквивалентных протонов спектр состоит из четырех линий с соотношением интенсивностей 1:3:3:1. В случае  $n$  эквивалентных протонов в спектре ЭПР будут наблюдаться  $n + 1$  линий. Помимо протонов к сверхтонкому расщеплению спектра ЭПР приводит взаимодействие с другими ядрами.

В общем случае если в радикале содержится  $n$  эквивалентных ядер, обладающих ядерным спином ( $I$ ), то число компонентов сверхтонкой структуры  $N_{СТС} = 2nI + 1$ .

Например, одно взаимодействие неспаренного электрона с ядром азота  $N^{15}$ , имеющим  $I = 1$ , приведет к появлению в спектре ЭПР трех линий.

Картина сверхтонкого расщепления спектров усложняется, когда в радикале присутствует несколько групп неэквивалентных ядер. В этом случае неспаренный электрон взаимодействует с одними ядрами в большей степени, чем с другими. Более сильное взаимодействие приводит к расщеплению спектра на компоненты, каждый из которых будет дополнительно расщепляться за счет более слабого взаимодействия с другими ядрами. Общее число линий в спектре при наличии неэквивалентных ядер будет  $N_{СТС} = \prod (2I_n + 1)$ .

Сложности в интерпретации таких спектров возникают не только из-за большого числа линий, но и в связи с наложением линий в суммарном спектре, что вызывает трудности в отнесении отдельных линий к взаимодействиям электронов с определенными ядрами (или группами ядер).

*Природа сверхтонкого взаимодействия.* Взаимодействие магнитных моментов ядер и электронов можно представить как рассмотрен-

ное выше диполь-дипольное взаимодействие. В этом случае локальное магнитное поле, создаваемое ядром в точке нахождения неспаренного электрона, будет зависеть от ориентации:  $H_{\text{лок}} = \mu_N \times \times [(3 \cos^2\theta - 1)/R^3]$ , где  $R$  — расстояние между ядром и электроном,  $\mu_N$  — проекция ядерного магнитного момента на направление внешнего магнитного поля,  $\theta$  — угол между внешним магнитным полем и линией, соединяющей ядро и электрон.

Так как  $H_{\text{лок}}$  зависит от угла  $\theta$ , то и сверхтонкое взаимодействие ядра и электрона в этом случае будет зависеть от этого угла. Такое сверхтонкое взаимодействие называется *анизотропным*. При анизотропном сверхтонком взаимодействии наблюдается анизотропное сверхтонкое расщепление спектра ЭПР; константа сверхтонкого расщепления  $a$  изменяется в зависимости от угла  $\theta$ .

Подобные эффекты особенно заметны, если парамагнитные частицы находятся в монокристаллах, которые определенным образом ориентированы относительно внешнего поля. В поликристаллических или аморфных образцах, где угол  $\theta$  изменяется в пределах от 0 до  $\pi$ , суммарный спектр представляет собой огибающую многих спектров с различной величиной расщепления.

Анизотропия СТС, подобно анизотропии  $g$ -фактора, является одной из причин уширения линий. В биологических системах эффект анизотропии СТС часто проявляется в тех случаях, когда движение парамагнитных частиц существенно заторможено, например в тканях, замороженных или лиофильно высушенных образцах. Если бы сверхтонкое взаимодействие электронов с ядрами имело только анизотропный характер, то в растворах малой вязкости или при локализации неспаренного электрона на  $s$ -орбитали не наблюдалось бы сверхтонкого расщепления спектров. В этих случаях происходит эффективное усреднение анизотропного взаимодействия до нуля и оно не может служить причиной расщепления спектров ЭПР.

Однако в спектре ЭПР атомарного водорода, где электрон локализован на сферической  $s$ -орбитали, наблюдается расщепление линий, обусловленное сверхтонким взаимодействием. Точно так же в растворах малой вязкости, когда анизотропные взаимодействия усредняются до нуля за счет быстрого движения парамагнитных частиц, например в спектрах свободных радикалов, проявляется хорошо выраженная СТС. Причиной этого является изотропное сверхтонкое взаимодействие. Изотропное взаимодействие проявляется в том случае, когда существует конечная вероятность нахождения электрона в точке, где расположено ядро. Таким свойством обладают только электроны на сферически-симметричных  $s$ -орбиталях. Энергия изотропного взаимодействия  $E_{\text{изо}} = (-8\pi/3) |\psi_0|^2$ , где  $\psi_0$  — значение волновой функции электрона в точке расположения ядра.

Таким образом, можно предположить, что изотропная СТС будет наблюдаться только в тех случаях, когда неспаренный электрон находится на  $s$ -орбитали. Между тем эксперименты свидетельствуют о том, что изотропная СТС наблюдается и тогда, когда неспаренный

электрон локализован на атомной  $p$ -орбитали или молекулярной  $\pi$ -орбитали атомов углерода, как, например, в метильном радикале  $(\text{CH}_3)^\cdot$  или анион-радикале бензола  $\text{C}_6\text{H}_6^-$ . Для  $p$ - и  $\pi$ -орбиталей углерода электронная плотность в точке ядра равна нулю.

Причиной появления изотропной СТС в  $\pi$ -радикалах является *поляризация спина*. Рассмотрим, например, фрагмент  $\text{>C} - \text{H}^\cdot$  с неспаренным электроном на  $p$ -орбитали углерода. На рис. 105 показаны два возможных спиновых состояния фрагмента  $\text{>C} - \text{H}$ . Влияние  $p$ -электрона на  $\sigma$ -связь атомов углерода и водорода приводит к тому, что более вероятным является состояние II. Таким образом, появляется некоторая спиновая плотность (или плотность неспаренного электрона) на  $1s$ -орбитали атома водорода. В свою очередь, это приводит к появлению изотропной СТС. Величина сверхтонкого расщепления в фрагменте  $\text{>C} - \text{H}^\cdot$  определяется соотношением  $a_{\text{H}} = Q\rho_{\text{C}}$ , где  $a_{\text{H}}$  — константа сверхтонкого взаимодействия на протоне;  $Q$  — константа Мак-Коннела, причем  $|Q| = (2/3) \cdot 10^{-3}$  Гл;  $\rho_{\text{C}}$  — плотность неспаренного электрона на атоме углерода, связанном с данным протоном.

Сверхтонкое взаимодействие неспаренного электрона, локализованного на атоме углерода, наблюдается и для фрагмента  $\text{>C} -$

$\text{CH}_3$ . Расщепление, обусловленное протонами  $\text{CH}_3$ -группы, объясняется *сверхсопряжением*. Сверхсопряжение возникает в результате прямого пространственного перекрытия электронных орбиталей протонов  $\text{CH}_3$ -группы с  $p$ -орбиталью атома углерода, на которой находится неспаренный электрон. Вследствие этого и возникает сверхтонкое взаимодействие неспаренного электрона с протонами  $\text{CH}_3$ -группы. СТС спектров является важной информативной характеристикой спектров ЭПР, поскольку по картине сверхтонкого расщепления спектров ЭПР оказывается возможным идентифицировать

химическую природу парамагнитных частиц, получить важные данные об электронной структуре парамагнитной частицы. Исследования анизотропии СТС помогает выяснить как «геометрию» самой парамагнитной частицы, так и характер встраивания этих частиц в различные матрицы. СТС спектров зависит от интенсивности и характера движения парамагнитных частиц, что позволяет проводить исследования методом ЭПР молекулярной динамики.

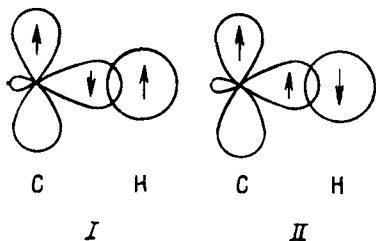


Рис. 105. Спиновые состояния (I, II) фрагмента  $\text{>C} - \text{H}$  (объяснения см. в тексте)

**Применение ЭПР в биологии.** Метод ЭПР начал применяться в биологических исследованиях в 50-е годы. Благодаря довольно высокой чувствительности и возможности в определении природы парамагнитных частиц этот метод нашел широкое применение для изучения целого ряда биологических процессов.

Первоначально биологические эксперименты проводили с лиофильно высушенными или замороженными образцами. Это было вызвано тем, что большое содержание жидкой воды в образцах приводило к сильному падению чувствительности радиоспектрометра. По мере развития техники ЭПР был создан целый ряд высокочувствительных спектрометров, что позво-

ляет проводить исследования и на водосодержащих образцах.

Сигналы ЭПР различных растительных и животных тканей были обнаружены в самых первых экспериментах. Парамагнитными центрами, ответственными за сигналы ЭПР тканей, являются свободные радикалы и целый ряд парамагнитных металлов. Дальнейшими исследованиями было установлено, что содержание свободных радикалов в различных тканях изменяется в пределах  $10^{16}$  —  $10^{18}$  на 1 г сухой массы.

Сигналы ЭПР различных тканей представляют собой несколько асимметричный синглет с  $g$ -фактором 2,003—2,005 и шириной между точками максимального наклона  $\Delta H_{\max} = 1 \div 2$  мТл. Сигнал имеет слабовыраженную СТС. Свободнорадикальные сигналы ЭПР тканей представлены на рис. 106.

Вид спектра, в особенности отсутствие хорошо разрешенной СТС, не позволяет сделать вывода о природе свободнорадикального сигнала тканей. Существующие в настоящее время данные указывают на то, что этот сигнал может быть обусловлен целым рядом свободнорадикальных продуктов, такими, как семихиноновые формы коэнзима  $Q$ , монодегидроаскорбиновой кислоты. Вклад в этот сигнал могут вносить и другие соединения: витамины, гормоны, флавины и др. Однако окончательного заключения о природе свободнорадикального сигнала тканей в настоящее время еще не сделано, хотя вопрос о природе указанных сигналов представляет не только теоретичес-

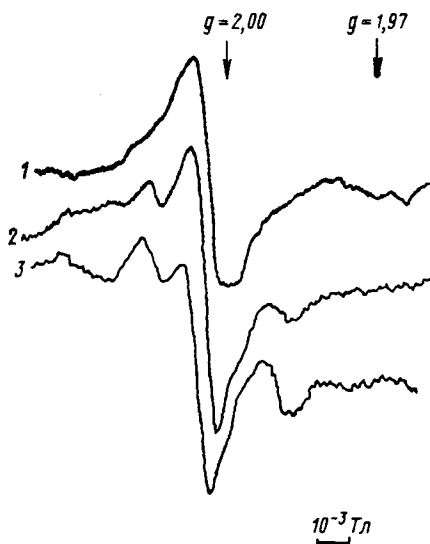


Рис. 106. Сигналы ЭПР печени (1), сердца (2) и бурого жира хомяков (3) при температуре  $-196^{\circ}\text{C}$

кий, но и практический интерес (существует обширный экспериментальный материал о связи сигналов ЭПР тканей с метаболизмом и патологическими состояниями клеток и тканей).

Помимо сигналов свободных радикалов в тканях наблюдается целый ряд сигналов металлов (Fe, Cu, Mn, Ni, Co). Эти металлы входят в состав металлопротеинов, принимающих участие в целом ряде ферментативных процессов. Железосодержащие белки (цитохромы, ферредоксины) являются компонентами электрон-транспортных цепей в митохондриях и хлоропластах. Цитохром  $P_{450}$  принимает участие в микросомальном окислении. Широко распространены медь-содержащие ферменты.

Комплексы металлов обладают гораздо более широкими сигналами, чем сигналы свободных радикалов, за счет сильного спин-орбитального взаимодействия, что приводит к коротким временам спин-решеточной релаксации, анизотропии  $g$ -фактора и сверхтонкого взаимодействия, отличиям значения  $g$ -фактора от  $g$ -фактора свободных радикалов. Кроме того, в связи с короткими  $T_1$  сигналы многих металлокомплексов не удается наблюдать при комнатной температуре. Для исследования этих металлокомплексов применяют охлаждение образцов до температур, близких к температурам жидкого гелия.

Предположение о том, что сигнал ЭПР тканей связан с ферментативными реакциями, привело к развитию исследований методом ЭПР.

Свободнорадикальные интермедиа ферментативных реакций являются короткоживущими продуктами. Для изучения ферментативных реакций были разработаны специальные экспериментальные подходы. В проточных системах фермент и субстрат быстро смешиваются, а затем смесь прокачивается через специальную кювету, помещенную в резонаторе ЭПР. Если скорость потока через кювету постоянна, то радиоспектрометр ЭПР будет регистрировать сигнал ЭПР, отражающий стационарную концентрацию радикалов, установившуюся в потоке. Поскольку концентрация радикалов в кювете постоянна, это позволяет надежно зарегистрировать и в дальнейшем проанализировать сигнал ЭПР. Если в какой-то момент времени остановить проток через кювету, то в этом режиме удастся наблюдать и кинетику исчезновения промежуточного продукта ферментативной реакции.

Другой метод, позволяющий регистрировать сигналы ЭПР короткоживущих радикалов, называется *методом матричной изоляции*. Он основан на том, что из реакционной смеси через определенные промежутки времени после начала реакции отбирают пробы, которые быстро замораживают. Сигнал ЭПР замороженных образцов отражает состояние в исследуемой системе в момент взятия пробы.

Методом ЭПР был исследован целый ряд ферментативных систем: обнаружены свободнорадикальные продукты субстратов; в ряде случаев оказалось возможным наблюдать за окислительно-восстановительными превращениями ионов металлов, входящих в активный центр фермента.



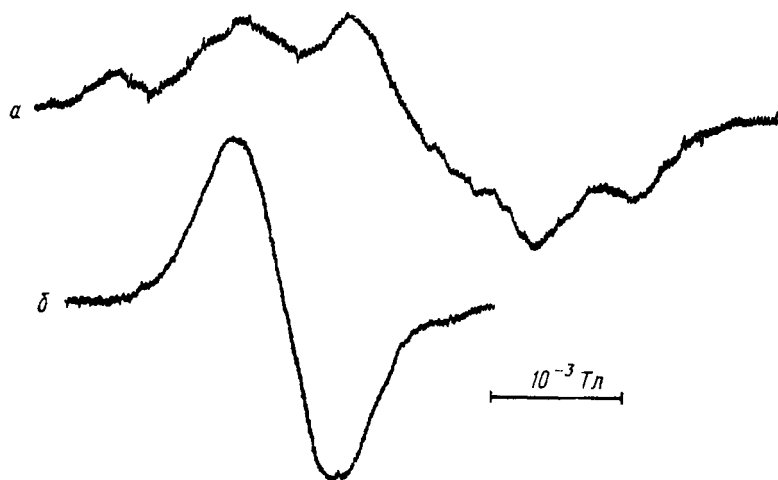


Рис. 107. Сигнал II (а) и сигнал I (б) зеленых растений

Метод ЭПР широко применяют в исследованиях фотосинтеза: изучается механизм первичных стадий разделения зарядов в реакционных центрах и дальнейший перенос электрона по цепи электронного транспорта. На сегодня существует большое количество экспериментальных данных в этой области. Вот некоторые из них.

В листьях и хлоропластах высших растений при комнатной температуре наблюдается два сигнала ЭПР: сигнал I и сигнал II (рис. 107). Сигнал II обладает слабовыраженной СТС, его ширина равна 1,6 мТл,  $g$ -фактор — 2,0045. Этот сигнал регистрируется и в темноте, несколько возрастает при освещении и медленно затухает после выключения света. Сигнал II исчезает при различных повреждениях фотосистемы II (ФСII), отсутствует у мутантов, не обладающих ФС II. Эти и ряд других данных показывают, что сигнал II ассоциирован с водоразлагающей системой высших растений — ФС II.

Природу этого сигнала исследовали во многих работах. В настоящее время считают, что он обусловлен семихиновой формой пластохинона. Импульсное освещение хлоропластов позволило выявить быстрые компоненты в кинетике этого сигнала и связать эти быстрые кинетические изменения сигнала с функционированием пластохинона в системе фоторазложения воды. При освещении листьев и хлоропластов наблюдается узкий ( $\Delta H_{\text{max}} = 0,7 \div 0,8$  мТл,  $g = 2,0025$ ) бесструктурный фотондуцированный сигнал, названный сигналом I. Этот сигнал относится к катионрадикальной форме пигмента  $P_{700}$  — реакционного центра ФС I. Сигнал I наблюдается только на свету и быстро исчезает после выключения света.

Помимо сигналов I и II в препаратах зеленых растений обнаружен еще целый ряд сигналов комплексов металлов, принимающих участие в первичных фотореакциях. Для наблюдения этих сигналов применяют сверхнизкие температуры, так как при комнатной температуре сигналы ЭПР металлокомплексов сильно уширены. К таким металлокомплексам относятся комплексы Fe, выполняющие роль акцепторов электрона в ФС I. В фотосистеме II в качестве одного из участников реакции разделения зарядов функционирует комплекс, в состав которого входят железо и хинон; исследуются комплексы Mn, принимающие непосредственное участие в разложении воды.

ЭПР применяют для изучения целого ряда других процессов, протекающих с участием свободных радикалов, например при поражении биологических объектов ультрафиолетовой и ионизирующей радиацией.

Для улавливания короткоживущих радикальных продуктов применяют замораживание объекта, поскольку при низких температурах затормаживаются вторичные реакции расходования первичных свободных радикалов. Для исследования короткоживущих продуктов относительно недавно разработан еще один метод, называемый *методом спиновых ловушек*.

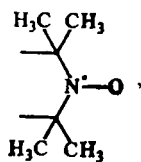
Суть этого метода заключается в том, что в исследуемую систему вводят вещества, взаимодействуя с которыми короткоживущие радикалы образуют более стабильные долгоживущие радикальные комплексы. Анализ спектров ЭПР этих стабильных аддуктов позволяет судить о природе короткоживущих радикалов, захваченных ловушкой.

Помимо изучения механизмов реакций, протекающих с участием парамагнитных частиц, метод ЭПР широко используют и для исследования структурно-динамических свойств макромолекул и биомембран. Для этих целей разработан метод спиновых зондов и меток.

Суть метода заключается в том, что в исследуемую систему вводят стабильный радикал, который либо ковалентно связывается с макромолекулой (спиновая метка), либо удерживается в системе за счет физических взаимодействий (спиновый зонд). Спектр ЭПР этого стабильного радикала чувствителен к свойствам среды, в которую он внедрен. Разработанные теоретические подходы позволяют связать параметры спектра ЭПР радикала с параметрами, характеризующими физические свойства системы: характером и скоростями движения молекул, конформационными изменениями структуры макромолекул и т. д.

В качестве спиновых зондов в основном используют *нитроксиль-*

*ные радикалы*. Эти радикалы содержат группировку



на которой локализован неспаренный электрон. Стабильность нит-

роксильных радикалов обусловлена рядом причин, одной из которых является экранирование  $N-O$  группы четырьмя  $CN_3$ -группами. Однако нитроксильные радикалы не являются абсолютно инертными. Они могут восстанавливаться целым рядом восстановителей, например аскорбиновой кислотой. Восстановление нитроксильных радикалов часто наблюдается при их внедрении в мембраны хлоропластов и митохондрий за счет реакций с эндогенными восстановителями: аскорбиновой кислотой, хинонами.

Особенности спектра ЭПР можно понять рассмотрев схему строения парамагнитного фрагмента нитроксильных радикалов (рис. 108). Неспаренный электрон локализован на  $2p$ -орбитали атома азота.

Взаимодействие неспаренного электрона с ядром атома азота приводит к появлению в спектре СТС, состоящей из трех линий равной интенсивности (спин ядра азота  $I = 1$ ). Поскольку неспаренный электрон находится на  $p$ -орбитали, не имеющей сферической симметрии, это приводит к появлению анизотропной СТС. За счет поляризации  $s$ -орбиталей атома азота неспаренным электроном по механизму спиновой поляризации появляется изотропное контактное взаимодействие между неспаренным электроном и ядром. Это приводит к проявлению в спектре ЭПР нитроксильных радикалов изотропной СТС. Анизотропия СТС хорошо наблюдается для нитроксильных радикалов, ориентированных относительно внешнего поля. Такие радикалы можно получить внедрив радикал в монокристалл. Спектры жестко ориентированного радикала приведены на рис. 108. Видно, что значение константы сверхтонкого расщепления зависит от ориентации радикала относительно внешнего поля. Наибольшее расщепление наблюдается, когда направление внешнего поля совпадает с осью  $z$ -радикала. В этом случае значение локального поля, создаваемого ядром азота в точке нахождения неспаренного электрона, максимально, поскольку угол  $\theta$  между внешним полем и осью, соединяющей электрон-ядро, равен нулю:

$$H_{\text{лок}} = \mu_N [(3 \cos^2 \theta - 1)/R^3].$$

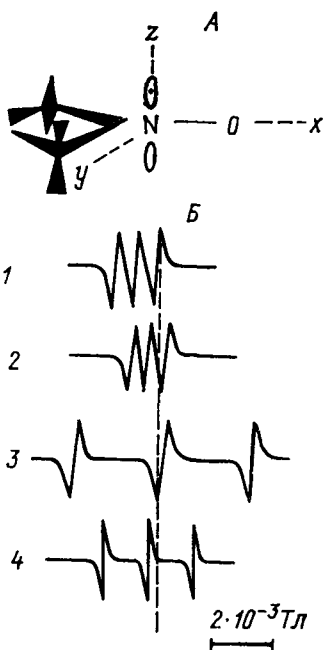
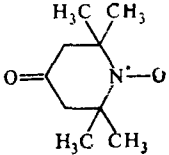
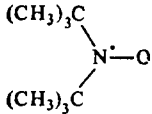


Рис. 108. Молекулярные оси парамагнитного фрагмента нитроксильных радикалов (А) и спектры ЭПР жестко ориентированного нитроксильного радикала (Б)

Магнитное поле ориентировано вдоль осей  $x-1$ ,  $y-2$ ,  $z-3$ ; 4 — спектр ЭПР радикала, быстро вращающегося в растворе

Когда угол  $\theta$  равен  $\pi/2$ , т. е. при ориентации осей  $x$  и  $y$  радикала параллельно внешнему полю константа СТС уменьшается. При изменении ориентации радикала относительно направления внешнего поля изменяется и  $g$ -фактор, что указывает на анизотропию  $g$ -фактора. Спектры ЭПР ориентированных радикалов характеризуются значениями констант СТС и  $g$ -фактора, наблюдающимися при ориентации внешнего поля по осям радикала.

Т а б л и ц а. Значения констант сверхтонкого взаимодействия ( $A$ ) и  $g$ -фактора для двух ориентированных радикалов

Радикал	$A_{zz} \cdot 10$ , мТл	$A_{xx} \cdot 10$ , мТл	$A_{yy} \cdot 10$ , мТл	$g_{zz}$	$g_{xx}$	$g_{yy}$
	31	5.2	5.2	2,0027	2,0089	2,0061
	31.78	7.59	5.95	2,00270	2,00872	2,00616

Примечание. Символы  $z$ ,  $x$ ,  $y$  относятся к случаям ориентации внешнего поля по соответствующим осям радикала.

Таким образом, спектры ЭПР нитроксильных радикалов «чувствительны» к ориентации радикала относительно внешнего поля.

Если нитроксильный радикал находится в жидкой среде, то быстрое изотропное движение радикала приводит к усреднению анизотропии и в спектрах проявляется изотропная СТС со средней константой взаимодействия:

$$a_0 = (1/3) (A_{xx} + A_{yy} + A_{zz});$$

$$g_0 = (1/3) (g_{xx} + g_{yy} + g_{zz}).$$

При уменьшении скорости молекулярного движения спектр ЭПР нитроксильного зонда претерпевает изменения, показанные на рис. 109. Эти изменения связаны с тем, что при малой скорости молекулярного движения анизотропные взаимодействия перестают усредняться и начинают вносить вклад в наблюдаемый спектр ЭПР. Сначала это проявляется в уширении линий и изменении соотношения амплитуд в пределах спектра ЭПР, затем в сдвиге крайних компонентов.

Для характеристики скорости молекулярного движения используют время корреляции, которое равно времени переориентации ра-

дикала на угол  $90^\circ$  от первоначального положения. Определение времен корреляции производят, исходя из различных параметров спектра ЭПР. Для значений времен корреляции, лежащих в интервале  $5 \cdot 10^{-11} < \tau < 10^{-9}$  с, используют соотношение

$$\tau_c = 6,65 \Delta H_{+1} (\sqrt{I_{+1}/I_{-1}} - 1) 10^{-10} \text{ с,}$$

где  $\Delta H_{+1}$  — ширина низкочастотного компонента в спектре ЭПР,  $I_{+1}$  и  $I_{-1}$  — амплитуды низкочастотного и высокочастотного компонентов спектра (рис. 109).

В случае более медленных движений ( $\tau \geq 7 \cdot 10^{-9}$  с) времена корреляции можно измерять по расстоянию между внешними экстремумами спектра, используя параметр  $(1 - S)$ , где

$$S = \frac{A'_{zz}}{A_{zz}} = \frac{H_{-1}(\tau) - H_{+1}(\tau)}{H_{-1}(\tau \rightarrow \infty) - H_{+1}(\tau \rightarrow \infty)},$$

где  $2A'_{zz}$  и  $2A_{zz}$  — расстояния между внешними экстремумами спектра при данном и предельно большом времени корреляции,  $H_{-1}$  и  $H_{+1}$  — напряженность поля, соответствующая этим экстремумам.

Время корреляции связано с параметром  $(1 - S)$  соотношением  $\tau = a(1 - S)^b$ , где  $a$  и  $b$  — параметры, зависящие от модели движения и электронной структуры радикала.

Разработанные теоретические подходы интерпретации спектров ЭПР учитывают не только скорости, но и характер движения, которое может быть изотропными или анизотропным ( $\tau$  для вращения относительно различных осей молекулы отличаются). Вращение может быть непрерывным либо происходить перескоками из одной ориентации в другую (*скачкообразная диффузия*). Время корреляции, характеризующее скорость вращения радикала, определяется вязкостью того участка системы (макромолекулы или биомембраны), где локализован нитроксильный радикал. Время корреляции приближенно можно оценить из соотношения Стокса — Эйнштейна

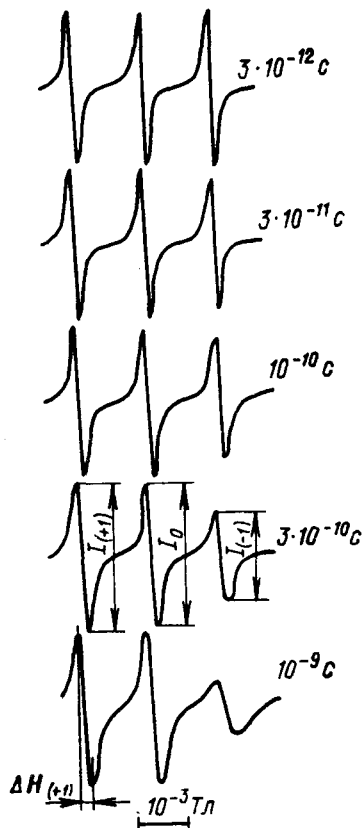


Рис. 109. Модельные спектры ЭПР нитроксильных радикалов при различных временах корреляции

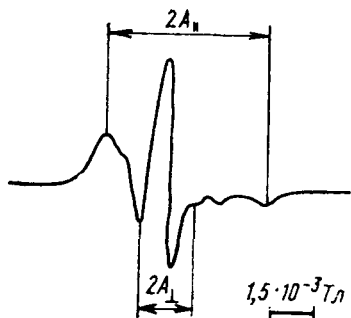


Рис. 110. Анизотропный спектр ЭПР спинного зонда в липосомах

ным подходом для интерпретации спектров ЭПР спиновых зондов и меток.

Помимо времен корреляции для характеристики движения нитроксильного радикала применяют и другие параметры. Например, параметр, характеризующий анизотропию движения нитроксильного радикала — *параметр упорядоченности*. При обсуждении спектра ЭПР нитроксильного радикала в монокристалле отмечалось, что константа сверхтонкого расщепления меняется в зависимости от ориентации осей радикала относительно внешнего магнитного поля. В поликристаллических образцах спектр ЭПР представляет собой суммарный сигнал радикалов, по-разному ориентированных по отношению к магнитному полю (рис. 110). Если исследуемая система обладает упорядоченностью (как, например, ориентированные бислои липидов), то встроенный в такую систему радикал может быть тоже ориентирован определенным образом. Вращение ориентированных липидных пленок в поле магнита меняет и ориентацию встроенного радикала относительно внешнего поля. В результате можно получить зависимость констант СТВ и  $g$ -фактора для различных ориентаций пленки и определить «геометрию» встраивания радикала в пленку.

При встраивании в липосомы радикалы то же могут быть ориентированы относительно плоскости липосомальной мембраны. Однако сами липосомы не ориентированы в поле магнита. В этом случае регистрируемый спектр ЭПР будет представлять собой суммарный спектр по-разному ориентированных радикалов, подобно спектру ЭПР в поликристаллических образцах, но в липосомальной мембране движение радикалов может происходить достаточно быстро, что будет частично приводить к усреднению анизотропии СТС. В этом случае в спектре ЭПР удастся выделить компоненты, которые обусловлены радикалами, ориентированными перпендикулярно и параллельно по отношению к внешнему полю (рис. 110).

$\tau = 4\pi R^3 \eta / (3kT)$ , где  $R$  — радиус нитроксильного радикала, если предполагать сферическую форму молекулы радикала;  $\eta$  — вязкость. Используя это соотношение, можно приближенно определить микровязкость, рассчитав  $\tau$  из спектра ЭПР.

В настоящее время для расчета времен корреляции, равно как и других параметров, характеризующих движение нитроксильного радикала в исследуемой системе, широко применяют моделирование спектров с помощью ЭВМ, что в ряде случаев является единственным

Крайние компоненты обусловлены радикалами, у которых  $p_z$ -орбиталь азота ориентирована параллельно полю; в центральной части спектра наблюдаются компоненты сигналов радикалов с перпендикулярной по отношению к внешнему полю ориентацией  $p_z$ -орбитали. Очевидно, что нарушение ориентации радикалов относительно плоскости мембраны или изменения самой мембраны будет приводить к изменениям характера движения радикала в мембране и тем самым в регистрируемом спектре.

Для характеристики анизотропии движения радикала и, следовательно, анизотропии исследуемой системы применяют *параметр ориентации*

$$S = \frac{A'_{\parallel} - A'_{\perp}}{A_{zz} - (1/2)(A_{xx} + A_{yy})}$$

где параметры  $A'_{\parallel}$  и  $A'_{\perp}$  приведены на рис. 110, а  $A_{zz}$ ,  $A_{xx}$ ,  $A_{yy}$  — параметры, получаемые из спектров ориентированных радикалов.

Если все молекулы зонда ориентированы так, что ось  $p_z$ -орбитали параллельна внешнему полю, то  $S = 1$ . Разупорядочение ориентации радикалов в системе уменьшает значение  $S$ ; для быстрого изотропного движения  $S = 0$ .

Таким образом, нитроксильные радикалы являются чувствительными «датчиками», позволяющими исследовать структурно-динамические свойства биомембран и макромолекул. Возможности метода спиновых зондов и меток не ограничиваются только измерениями времени корреляции и параметров ориентации. С помощью этого метода исследуют такие процессы, как движение липидов вдоль поверхности мембраны (латеральная диффузия) и перемещение липидных молекул между наружной и внутренней поверхностями мембраны (флип-флоп-переход). С помощью спин-меток изучают пространственное расположение отдельных групп в белках и нуклеиновых кислотах, конформационные переходы, связанные с функционированием ферментов, и целый ряд других проблем молекулярной динамики.

В настоящее время разрабатываются методы, позволяющие существенно расширить диапазон времен, молекулярных движений, измеряемых с помощью спиновых меток и зондов. В обычном варианте метода спиновых меток удается измерять времена корреляции в диапазоне  $10^{-11}$  —  $10^{-7}$  с. Сейчас становится возможным измерять существенно более медленные движения (до  $10^{-3}$  с), характерные для движения интегральных мембранных белков.

**Некоторые экспериментальные приемы.** Современные спектрометры ЭПР обладают довольно высокой чувствительностью, которая определяется количеством парамагнитных центров, обнаруживаемых прибором. Эти данные приводятся обычно в описании спектрометров. В настоящее время спектрометры ЭПР трехсантиметрового диапазона способны обнаружить в образце примерно  $10^{10}$  парамагнитных частиц (при отношении сигнал/шум, равном единице). Од-

нако для реализации высокой чувствительности прибора необходимо учитывать целый ряд факторов, которые кратко обсуждены в этом разделе.

*Подготовка образцов.* При измерениях сигналов ЭПР образцы помещают в цилиндрические ампулы или плоские кюветы в зависимости от типа резонатора.

Образцы могут быть лиофильно высушены, заморожены либо находиться в водном или другом растворе в зависимости от условий эксперимента. Наибольшие затруднения вызывают измерения сигналов ЭПР образцов, содержащих большие количества жидкой воды, поскольку присутствие воды вызывает заметное падение чувствительности спектрометра. В силу этого для измерения водных растворов или других водосодержащих образцов применяют цилиндрические ампулы диаметром не более 1 мм или плоские кварцевые кюветы с внутренним зазором около 0,25 мм. В общем случае размер образца (высота заполнения ампулы, диаметр ампулы) определяется экспериментально для данного типа образцов. Размеры образца выбираются такими, чтобы получить максимальный по величине сигнал.

*Амплитуда модуляции.* В большинстве современных спектрометров частота модуляции составляет 100 кГц (например, РЭ-1306, РЭ-1307, Varian E3, E4). В разделе, посвященном описанию конструкции спектрометров ЭПР, отмечалось, что при большой амплитуде модуляции наблюдаются сильные искажения спектра. При увеличении амплитуды модуляции  $H_m$  амплитуда сигнала сначала линейно возрастает, а затем начинает уменьшаться. Возрастание амплитуды, однако, сопровождается уширением сигнала. Для линий гауссовой формы максимальное значение амплитуды сигнала достигается при  $H_m$ , равном  $\sim 1,8 \Delta H_{\max}$ , линия при этом уширена в 1,6 раза.

Амплитуду модуляции выбирают из требований эксперимента. Если необходимо зарегистрировать слабый сигнал, то амплитуда модуляции выбирается такой, чтобы получить сигнал максимальной величины. В этом случае, если требуется достичь хорошего разрешения сигнала, амплитуда модуляции выбирается малой ( $\sim 5$  раз меньше  $\Delta H_{\max}$ ), чтобы получить неискаженный сигнал.

*Мощность СВЧ-излучения.* Если увеличивать мощность СВЧ-излучения, падающего на образец, то амплитуда сигнала сначала возрастает, затем по достижении максимума может уменьшиться. Этот эффект называют *насыщением*; он связан с тем, что при больших мощностях СВЧ процессы релаксации не могут поддерживать больщмановское распределение в системе спинов, что приводит к выравниванию населенностей верхнего и нижнего уровней и падению сигнала. В условиях насыщения происходит и некоторое уширение линий. Мощность СВЧ подбирают экспериментальным путем. Регистрируют зависимость амплитуды сигнала от СВЧ-мощности, а затем выбирают мощность СВЧ такую, при которой не происходит искажения формы линий (приблизительно на 25% ниже той, при которой наблюдается максимальный сигнал).

*Определение концентрации парамагнитных центров.* Концентрацию парамагнитных центров определяют путем сравнения исследуемого сигнала с сигналом стандарта. Площадь под кривой поглощения пропорциональна концентрации парамагнитных частиц. Подсчитав площади под кривыми поглощения исследуемого сигнала и стандарта, можно определить концентрацию парамагнитных центров в исследуемом образце:  $c_x = c_{\text{ст}} S_x / S_{\text{ст}}$ . В качестве стандартов обычно применяют стабильные радикалы: дифенилпикрилгидразил, нитрокислые радикалы. Можно использовать соли парамагнитных ионов:  $\text{MnSO}_4$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ .

Для определения концентрации измерение сигналов исследуемого образца и стандарта нужно проводить в отсутствие насыщения и при одинаковой температуре. Амплитуду модуляции выбирают так, чтобы получить максимальную величину сигнала, особенно при регистрации слабых сигналов. Это



важно для надежного вычисления площади. Растворители у стандарта и образца должны быть одинаковы. Регистрацию сигналов нужно проводить в одной и той же (или одинаковых) ампуле или кювете.

Концентрацию парамагнитных частиц в исследуемом образце определяют выражением

$$c_x = c_{ст} \frac{A_x (\text{скан})_x^2 G_{ст} H_{мод}^{ст} g_{ст}^2 S(S+1)_{ст}}{A_{ст} (\text{скан})_{ст}^2 G_x H_{мод}^x g_x^2 S(S+1)_x}$$

где  $A$  — площадь под кривой поглощения,  $G$  — усиление усилителя,  $H_{мод}$  — амплитуда модуляции, (скан) — величина развертки магнитного поля.

Площадь под кривой поглощения вычисляют путем двойного графического интегрирования сигнала, поскольку сигнал регистрируется в виде первой производной. В современных спектрометрах эта процедура выполняется с помощью компьютера.

*Определение констант сверхтонкого расщепления,  $\Delta H_{max}$  и  $g$ -фактора.* Определение констант сверхтонкого расщепления проводят с использованием эталонов. В качестве эталонов удобно использовать образцы, спектр которых состоит из нескольких линий, например  $Mn^{2+}$  в кристаллической решетке  $MgO$ . Спектр ЭПР этого эталона состоит из шести линий, далеко отстоящих друг от друга. Сигналы свободных радикалов при одновременной записи этого эталона с исследуемым образцом располагаются между 3-й и 4-й линиями в спектре марганца. Расстояние между этими линиями равно 8,67 мТл. Зная это значение, легко вычислить константы СТС в спектре исследуемого радикала. Точно так же определяют и  $\Delta H_{max}$  одиночной линии.

$g$ -Фактор исследуемого сигнала можно также определить с использованием эталона  $Mn^{2+}$  в  $MgO$ :

$$g_x = \frac{g_3 g_4}{g_4 + (g_3 - g_4) l/d}$$

где  $g_3$  и  $g_4$  —  $g$ -факторы 3-й и 4-й линий в спектре  $Mn^{2+}$ ;  $d$  — расстояние между ними на ленте самописца;  $l$  — расстояние между центром линии образца и 3-й линии эталона. Числовые значения:  $g_3 = 2,031$ ;  $g_4 = 1,9812$ .

### Примерное построение учебной работы

Для выполнения работы требуются: плоская кварцевая кювета с внутренним зазором 0,25 мм или кварцевые капилляры с внутренним диаметром 0,8—1 мм; дифенилкрилгидразил (ДФПГ), содержание ДФПГ в образце  $10^{-9}M$ ; нитроксильный радикал в виде раствора известной концентрации ( $10^{-2}$  —  $10^{-3} M$ ); эталонный образец  $Mn^{2+}$  в  $MgO$  (обычно придается к спектрометрам ЭПР).

1. Ознакомиться с устройством прибора и подготовить прибор к работе по приложенной инструкции.

2. Выбрать условия регистрации сигналов ЭПР:

а) записать сигналы ЭПР и раствора нитроксильного радикала ( $10^{-4} M$ ), выбрав соответствующий диапазон и скорость развертки;

б) исследовать влияние амплитуды высокочастотной модуляции магнитного поля на форму сигналов ДФПГ и нитроксильного радикала.

3. Определить параметры сигналов ЭПР нитроксильного радикала:

а) записать сигнал ЭПР раствора нитроксильного радикала совместно с сигналом эталона  $Mn^{2+}$  в  $MgO$ ;

б) пользуясь значениями  $g$ -факторов 3-й и 4-й линий спектра  $Mn^{2+}$  в  $MgO$ , определить  $g$ -факторы для каждой из трех линий спектра нитроксильного радикала;

в) рассчитав из спектра  $Mn^{2+}$  в  $MgO$  масштаб на ленте самописца в миллисекундах, определить константу сверхтонкого взаимодействия и ширину между точками максимального наклона  $\Delta H_{max}$  для каждого из компонентов спектра нитроксильного радикала;

г) приготовить раствор нитроксильного радикала ( $10^{-5} - 10^{-4} M$ ) в этиловом спирте; в смеси 70%-ного спирта и 30%-ного глицерина; в смеси 30%-ного спирта и 70%-ного глицерина; в чистом глицерине.

Зарегистрировать сигналы нитроксильного радикала в указанных средах и рассчитать  $\tau$  для каждого спектра.

4. Зарегистрировать сигналы ЭПР хлоропластов:

а) зарегистрировать сигнал ЭПР от суспензии хлоропластов (2 мг/мл) в темноте и при освещении красным светом ( $\lambda > 700$  нм, фильтр КС-19);

б) используя сигнал  $Mn^{2+}$  в  $MgO$ , определить  $g$ -фактор и ширину между точками максимального наклона для темного и фотоиндуцированного сигналов ЭПР хлоропластов;

в) выключить развертку и установить величину постоянного магнитного поля, соответствующую максимуму фотоиндуцированного сигнала; включая и выключая свет, зарегистрировать кинетику фотоиндуцированного сигнала ЭПР;

г) зарегистрировать сигнал ЭПР хлоропластов при освещении красным светом ( $\lambda = 650$  нм и  $\lambda \geq 700$  нм); добавить к суспензии хлоропластов ингибитор фотосинтеза диурон ( $10^{-5} M$ ), наблюдая за его влиянием на величину сигнала, индуцированного светом той и другой волны;

д) определить концентрацию фотоиндуцированных парамагнитных центров в хлоропластах; в качестве эталона использовать раствор водорастворимого нитроксильного радикала в воде ( $10^{-5} - 10^{-4} M$ ); спектры исследуемой суспензии хлоропластов и стандарта записывать либо в одной и той же плоской кювете, либо в одном и том же капилляре.

Концентрацию парамагнитных центров рассчитывать по формуле

$$\frac{c_x}{c_{ст}} = \frac{D_x I_x (\Delta H_{max}^x)^2 H_{mod}^{ст} G_{ст}}{D_{ст} I_{ст} (\Delta H_{max}^{ст})^2 H_{mod}^x G_x}$$

где  $D$  — фактор мультиплетности,  $D = \sum_i I_i / I_{max}$ ;  $\sum_i I_i$  — сумма амплитуд всех линий в спектре;  $I_{max}$  — амплитуда максимальной линии.

## § 2. Ядерный магнитный резонанс

Явление *ядерного магнитного резонанса* (ЯМР) сходно по принципам с ЭПР, но в отличие от последнего ЯМР обусловлено наличием магнитных моментов у ряда ядер.

Магнитный момент ядра связан с собственным моментом количества движения ядра, равным  $I\hbar/(2\pi)$ , где  $I$  — спин ядра.  $I$  может быть равным нулю, целым или полуцелым числом. Магнитным моментом обладают ядра, у которых  $I \neq 0$ . Магнитный момент ядра связан с механическим моментом соотношением  $\mu = \gamma [I\hbar/(2\pi)]$ , где  $\gamma$  — гиромагнитное отношение данного ядра.

Спин протонов и нейтронов равен  $1/2$ , отсюда можно предположить, какие ядра обладают магнитным моментом. Если в ядре содержится четное число протонов и нейтронов, т. е. в системе Менделеева элемент имеет четный порядковый номер и четное массовое число, то  $I = 0$ . Следовательно, такое ядро не обладает магнитным моментом (например,  $^{12}_6C$ ,  $^{16}_8O$ ). Если порядковый номер нечетный, а

массовое число четное (ядро содержит нечетное число протонов и нейтронов), то спин ядра целый ( $^{14}_7\text{N}$ ,  $^2_1\text{D}$ ). При нечетном массовом числе ядро содержит нечетное число протонов и четное число нейтронов (или наоборот), спин ядра — полуцелый ( $^1_1\text{H}$ ,  $^{19}_9\text{F}$ ,  $^{31}_{15}\text{P}$ ,  $^{15}_7\text{N}$ ,  $^{13}_6\text{C}$ ).

Пусть ядро обладает спином  $I = 1/2$ . При помещении вещества, содержащего такие ядра (например, протоны), в магнитное поле  $H$  магнитные моменты ядер ориентируются параллельно или антипараллельно приложенному магнитному полю. Энергия состояний с параллельной и антипараллельной ориентациями равна соответственно  $-\mu H_0 + \mu H_0$ . Разность энергий  $\Delta E$  равна  $2\mu H_0$ .

При воздействии на систему ядер электромагнитного излучения с частотой  $\nu$  это излучение будет поглощаться в системе при условии  $h\nu_0 = 2\mu H_0$ , что аналогично условию резонанса в ЭПР. Магнитные моменты ядер существенно меньше магнитных моментов электронов (для протона примерно в 2000 раз). В силу этого резонансные частоты ядер расположены в более низкочастотной области (от 1 до 500 МГц).

В этом разделе не будут подробно рассмотрены переходы в системе ядер под влиянием радиочастотного излучения, ибо они аналогичны ЭПР. Необходимо лишь отметить, что разница в населенностях верхнего и нижнего состояний для ЯМР очень мала и составляет при комнатной температуре  $\sim 10^{-6}$  от общего числа ядер. Это приводит к тому, что интенсивность поглощения в спектрах ЯМР мала по сравнению с ЭПР. Спектр ЯМР регистрируется в виде зависимости поглощенной в образце энергии от частоты  $\nu$ .

### Классическое описание ЯМР

Для объяснения явления ЯМР часто применяют описание, основанное на классических представлениях о поведении магнитного момента ядра. Такое описание подходит для рассмотрения явлений магнитного резонанса вообще. Для ЯМР оно оказывается более наглядным при обсуждении целого ряда эффектов. Магнитный момент образца складывается из магнитных моментов отдельных ядер:  $\mathbf{M} = \sum_i \boldsymbol{\mu}_i$ .

В отсутствие внешнего поля магнитные моменты ядер ориентированы хаотически и суммарный магнитный момент  $\mathbf{M}$  равен нулю.

Если к образцу приложить магнитное поле напряженностью  $H_0$ , то магнитные моменты ядер начинают прецессировать в поле  $H$  вокруг направления вектора  $H_0$  с частотой  $\omega_0 = \gamma H_0$  в лабораторной системе координат с осью  $z$ , направленной по  $H_0$  (рис. 111). Прецессия магнитных моментов в поле  $H_0$  описывается известной в механике теоремой Лармора,  $\omega_0$  — частота ларморовой прецессии.

Каково поведение  $\boldsymbol{\mu}$  в системе координат, вращающейся относительно лабораторной с частотой  $\omega$  (рис. 111)? В такой системе ко-

ординат  $\mu$  прецессирует с частотой, равной  $(\omega' - \omega_0)$  относительно эффективного поля  $\mathbf{H}$ , т. е.  $(\omega - \omega_0) = \gamma H$ . Тогда  $\mathbf{H} = \omega_0/\gamma - \omega/\gamma = \mathbf{H}_0 - \omega/\gamma$ . Величину  $\omega/\gamma$  можно рассматривать как магнитное поле, направленное антипараллельно  $\mathbf{H}_0$ .

В квантово-механическом описании магнитного резонанса систему спинов выводят из равновесия электромагнитным излучением определенной частоты. В рассматриваемой модели действие такого излучения можно представить следующим образом. Если к системе приложить линейно поляризованное в плоскости  $xy$  переменное поле с частотой  $\omega$  и напряженностью  $2H_1$ , то такое поле можно разложить на две составляющие с напряженностью  $H_1$ , поляризованные по кругу в противоположных направлениях. В дальнейшем будет рассмотрена только составляющая, вращение которой совпадает с направлением прецессии магнитного момента. В этом случае во вращающейся системе координат на магнитный момент  $\mu$  действует эффективное поле, равное векторной сумме  $\mathbf{H}_0$ ,  $\omega/\gamma$  и  $\mathbf{H}_1$  (рис. 111):

$$\mathbf{H}_{\text{эфф}} = \mathbf{H}_0 - (\omega/\gamma) + \mathbf{H}_1.$$

Если  $\omega = \omega_0$ , то  $\mathbf{H}_{\text{эфф}} = \mathbf{H}_1$ . Это означает, что при резонансе, т. е. при совпадении частоты вращения поля  $\mathbf{H}_1$  с частотой ларморовой прецессии магнитного момента  $\omega_0$ , магнитный момент ядра отклоняется от своего первоначального значения и начинает прецессировать относительно поля  $\mathbf{H}_1$  с частотой  $\omega_1 = \gamma H_1$ .

При приложении магнитного поля  $\mathbf{H}_0$  к образцу в силу того, что существует некоторый переизбыток ядер, ориентированных параллельно внешнему полю, появляются макроскопический магнитный момент, прецессирующий относительно направления внешнего поля, и составляющая  $M_z$  относительно лабораторной оси  $z$  (рис. 112). В плоскости  $xy$  составляющая магнитного момента равна нулю, по-

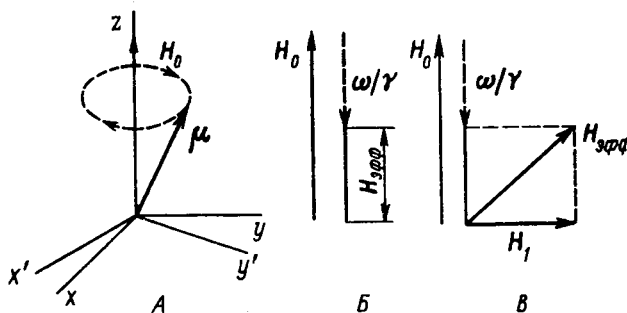


Рис. 111. Ларморова прецессия магнитного момента протона в магнитном поле (А). Эффективное магнитное поле во вращающейся системе координат в отсутствие (Б) и в присутствии (В) поля  $\mathbf{H}_1$

сколько индивидуальных ядерные моменты прецессируют не в фазе.

При резонансе  $\mathbf{M}_z$  отклоняется от равновесного положения, уменьшается и появляется составляющая этого момента относительно оси  $y'$ , т. е.  $\mathbf{M}'_y$  (рис. 113). При выключении поля  $H_1$  система возвращается к равновесию, компонент  $\mathbf{M}_z$  приобретает равновесное значение, а компонент  $\mathbf{M}'_y$  вследствие расфазировки движения моментов стремится к нулю.

Возвращение системы к равновесию описывается выражениями

$$\mathbf{M}_z(t) = \mathbf{M}_0(1 - e^{-t/T_1});$$

$$\mathbf{M}'_y(t) = \mathbf{M}'_y(0) e^{-t/T_2},$$

где  $T_1$  и  $T_2$  — времена продольной и поперечной релаксации. Время  $T_1$  аналогично времени спин-решеточной релаксации,  $T_2$  — спин-спиновой релаксации, которые были рассмотрены при обсуждении ЭПР.

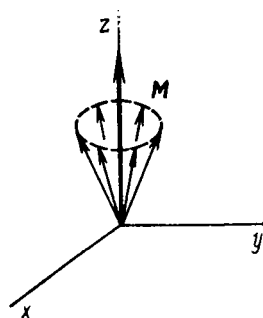


Рис. 112. Макроскопическая намагниченность ( $\mathbf{M}$ ), складывающаяся из магнитных моментов отдельных ядер  $\mu$

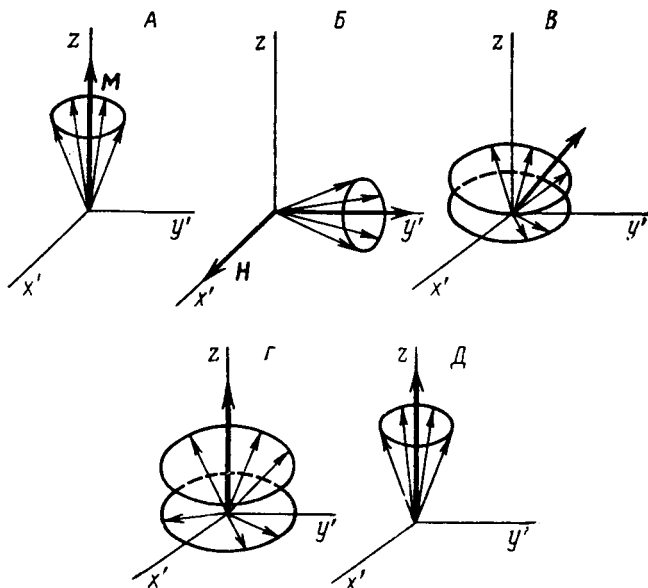


Рис. 113. Макроскопическая намагниченность ( $\mathbf{M}$ ) и магнитные моменты отдельных ядер ( $\mu$ ); А — до резонанса; Б — поворот на  $90^\circ$  под действием поля  $H_1$ ; В — расфазировка движения  $\mu$  и уменьшение  $\mathbf{M}'_y$ ; Г — полная расфазировка ядерных моментов и восстановление  $\mathbf{M}_z$ ; Д — восстановление  $\mathbf{M}_z$  до равновесного значения

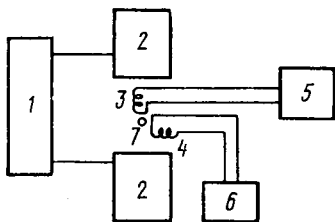


Рис. 114. Простейшая схема спектрометра ЯМР:

1 — устройство, управляющее разверткой магнитного поля, 2 — магнит, 3 — катушка, создающая поле  $H_1$ , 4 — приемная катушка, 5 — генератор переменного поля, 6 — приемник, 7 — образец.

жидит катушка, расположенная по оси  $x$ , а сигнал ЯМР регистрируется с помощью катушки, расположенной по оси  $y$ . Напряженность поля  $H_0$ , создаваемого основным магнитом, можно менять, используя генератор развертки поля. При изменении напряженности магнитного поля создаются резонансные условия для отдельных групп ядер, составляющая  $M_y$  достигает максимального значения, что и регистрируется приемной катушкой. Условия резонанса достигаются и тогда, когда  $H = \text{const}$ , а частота электромагнитного излучения  $\nu$  изменяется. В современных спектрометрах ЯМР чаще используют второй способ регистрации спектров ЯМР.

Математическое описание рассмотренной модели было проведено Ф. Блохом. Предложенные им уравнения позволяют провести количественные описания системы. Не рассматривая уравнений Блоха, необходимо отметить один результат — количественное выражение для компонента  $M'_y$ , поскольку именно этот компонент регистрируется как сигнал поглощения в спектрометрах ЯМР:

$$M'_y = \frac{M_0 \gamma T_2 H_1}{1 + T_2^2 (\omega_0 - \omega)^2 + \gamma^2 H_1^2 T_1 T_2}$$

Из этого выражения видно, что значение  $M'_y$  зависит от ряда факторов, например  $T_1$  и  $T_2$ . Кроме того, величина  $M_0 = 2 [H_0 \mu_m^2 z^i / (kT)] N$ . Это означает, что интенсивность поглощения зависит от  $H_0$  и числа ядер  $N$ , обладающих магнитным моментом. Интенсивность поглощения, таким образом, связана и с концентрацией ядер.

**Времена релаксации.** Время  $T_1$ , характеризующее скорость восстановления равновесного значения продольной намагниченности, отражает эффективность взаимодействия системы спинов с решеткой.

Существует несколько механизмов спин-решеточного взаимодействия. В жидкостях основным механизмом релаксации является *диполь-дипольное взаимодействие*. В результате быстрого вращатель-

В лабораторной неподвижной системе координат поперечная по отношению к  $H_0$  намагниченность, возникающая в момент резонанса, вращается по отношению к неподвижной системе координат. Это позволяет зарегистрировать ее с помощью датчика, расположенного по оси  $y$ .

Современные спектрометры ЯМР — весьма сложные приборы, имеющие в своем составе ЭВМ. Здесь будет рассмотрена простейшая схема спектрометра ЯМР (рис. 114).

Поле  $H_0$  создается магнитом, ось которого является осью  $z$  лабораторной системы координат. Источником поля  $H_1$  служит катушка, расположенная по оси  $x$ , а сигнал ЯМР регистрируется с помощью катушки, расположенной по оси  $y$ .

Напряженность поля  $H_0$ , создаваемого основным магнитом, можно менять, используя генератор развертки поля. При изменении напряженности магнитного поля создаются резонансные условия для отдельных групп ядер, составляющая  $M_y$  достигает максимального значения, что и регистрируется приемной катушкой. Условия резонанса достигаются и тогда, когда  $H = \text{const}$ , а частота электромагнитного излучения  $\nu$  изменяется. В современных спектрометрах ЯМР чаще используют второй способ регистрации спектров ЯМР.

ного и поступательного движения молекул создаются флуктуирующие магнитные поля, в спектре которых могут найтись поля с частотой  $\omega_0$ . Такие поля могут вызывать переходы в системе спинов.

Эффективность этого взаимодействия сильно зависит от состояния решетки. В твердых телах движение молекул существенно заторможено, поэтому в спектре колебаний решетки более выражены низкочастотные компоненты.

Значительный вклад в спин-решеточное взаимодействие вносит присутствие в среде парамагнетиков. Магнитный момент электрона приблизительно в  $10^3$  раз больше магнитного момента протона, что и приводит к ускорению процесса продольной релаксации. Например, для бензола в обезгаженном растворе сероуглерода  $T_1 = 60$  с. В присутствии кислорода, являющегося парамагнетиком,  $T_1$  уменьшается до 2,7 с. В органических жидкостях  $T_1$  для протонов составляет несколько секунд или менее. Парамагнетики уменьшают  $T_1$  до десятых и даже сотых долей секунды.

Еще одним типом взаимодействия, существенным в процессе спин-решеточного взаимодействия, является *квадрупольное взаимодействие*. Оно имеет не магнитную, а электрическую природу и связано с тем, что квадрупольный момент обусловлен несимметричным распределением заряда в ядре. Наличие квадрупольного момента приводит к тому, что такие ядра переориентируются под действием переменного градиента электрического поля, происходит сильное уширение сигналов ЯМР ядер, в связи с чем эти ядра не могут изучаться методом ЯМР. Этот тип взаимодействия характерен для ядер с  $I > 1/2$  и проявляется в несимметричных молекулах. Время поперечной, или спин-спиновой, релаксации  $T_2$  характеризует взаимодействие внутри спиновой системы.

Рассмотрение векторной модели ЯМР позволяет сделать вывод, что  $T_2 \leq T_1$ , поскольку после выключения поля  $H_1$  восстановление поперечной намагниченности не может происходить быстрее восстановления продольной намагниченности. В жидкостях и газах  $T_1$  и  $T_2$  близки по величине, однако в твердом теле  $T_2 \ll T_1$ . Это связано с тем, что в твердом теле каждое ядро испытывает влияние локального поля, создаваемого соседними ядрами. Напряженность этого поля  $H_{\text{лок}} = (\mu/R^3)(3 \cos^2\theta - 1)$ , где  $R$  — расстояние между ядрами,  $\theta$  — угол между вектором  $\mu$  и  $H_0$ . Поскольку  $H_{\text{лок}}$  неодинаково по значению и знаку для различных ядер, прецессия магнитных моментов ядер будет происходить с разными частотами  $\omega = \gamma(H_0 + H_{\text{лок}})$ . Разброс частот составит, таким образом,  $\Delta\omega = \gamma H_{\text{лок}}$ ; это составит  $\Delta\nu = \Delta\omega/(2\pi) = [\gamma/(2\pi)] H_{\text{лок}} \sim 10^4$  Гц, что соответствует времени  $T_2 \sim 10^{-5} \div 10^{-4}$  с.

Ширина линии в спектрах ЯМР связана с временами  $T_1$  и  $T_2$  соотношением  $\Delta\omega_{1/2} = (2/T_2)(1 + \gamma^2 H_1^2 T_1 T_2)^{1/2}$ . В том случае, если  $T_1 \gg T_2$ ,  $\Delta\omega_{1/2} = 2/T_2$ , или в герцах  $\Delta\nu_{1/2} = 1/(\pi T_2)$ .

В вязких жидкостях  $T_2$  составляет несколько секунд, что соответствует ширине линии в доли герца. В жидкостях проявляется еще один эффект уширения линий, связанный с неоднородностью магнитного поля лабораторного магнита. Этот эффект чисто аппаратный и устраняется специальными приемами коррекции напряженности поля магнита.

Если неоднородность поля магнита равна  $\Delta H_0$ , то это приведет к дополнительному уширению линии, равному  $\gamma \Delta H_0 / (2\pi)$ . Тогда с наблюдаемой шириной линии будет связано время  $T_2^*$ ;  $v_{1/2набл} = [1/(\pi T_2^*)] T_2^*$  будет включать вклад как от естественного времени  $T_2$ , так и обусловленного неоднородностью поля:

$$1/T_2^* = 1/T_2 + \gamma \Delta H_0 / 2.$$

Одним из приемов устранения влияния неоднородностей поля служит вращение образца в поле магнита. При этом все ядра находятся в некотором усредненном поле.

**Импульсные методы в ЯМР.** В методе ЯМР в отличие от ЭПР широко распространены *импульсные методы* исследования, с их помощью измеряют времена  $T_1$  и  $T_2$ . На основе этих измерений можно получить ценную информацию о процессах молекулярной диффузии, химическом обмене, конформационной подвижности.

В экспериментах исследуемую систему подвергают воздействию одного или последовательности импульсов ларморовой частоты, которые выводят систему из равновесия, а затем наблюдают восстановление равновесия после окончания импульса. В импульсных экспериментах чаще всего пользуются импульсами, поворачивающими  $M_0$  на  $90^\circ$  или  $180^\circ$ , или их последовательностями. Угол, на который поворачивается вектор  $M_0$ , определяется соотношением  $\theta = \gamma H_1 t_p$  (рад), где  $\gamma$  — гиромагнитное отношение для данного ядра,  $t_p$  — длительность импульса. Изменяя  $H_1$  и  $t_p$ , можно получить  $\theta = 90^\circ$  или  $180^\circ$ .

Один из импульсных методов — *спад индуцированного сигнала* (СИС). Вдоль оси  $x'$  во вращающейся системе координат прикладывается импульс, отклоняющий  $M$  от оси  $z$  на  $90^\circ$ . По окончании импульса  $M$  будет направлен по оси  $y'$  (рис. 115). Возникшая при этом поперечная намагниченность будет зафиксирована измерительной катушкой. Этот сигнал называется *сигналом свободной индукции*. Поперечная релаксация, развивающаяся после окончания импульса, приводит к уменьшению поперечной намагниченности (рис. 115). Спад сигнала свободной индукции происходит с характеристическим временем  $T_2$ .

Если в образце присутствует один тип ядер, то спад сигнала свободной индукции будет экспоненциальным. В том случае, если в образце присутствуют ядра с различающимися ларморовыми частотами, спад сигнала будет более сложным. Анализируя такую кривую, можно получить информацию и о спектре ларморовых частот. В импульсном способе измерения времени  $T_1$  к образцу прикладывается



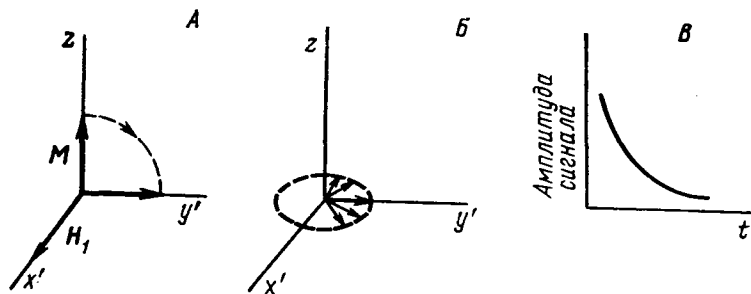


Рис. 115. Движение намагниченности ( $M$ ) под влиянием 90-градусного импульса. *A* — 90-градусный импульс поворачивает  $M$  от равновесного значения до совпадения с осью  $y'$ ; *Б* — расфазировка ядерных магнитных моментов; *В* — экспоненциальный спад индуцированного сигнала

ся такая последовательность импульсов:  $180^\circ$ ,  $\tau$ ,  $90^\circ$  ( $\tau$  — промежуток времени между импульсами).  $180^\circ$ -ный импульс инвертирует намагниченность вдоль оси  $z'$ . После окончания импульса в результате продольной релаксации  $M_z$  меняется от значения  $M_0$ , проходит через нуль к равновесному значению по закону  $e^{-\tau/T_1}$ . За время  $\tau$  разность между  $M_z$  и его равновесным значением  $M_0$  уменьшится в  $e^{-\tau/T_1}$  раз. Если по истечении времени  $\tau$  приложить к системе  $90^\circ$ -ный импульс, то вектор  $M$  окажется направленным по оси  $y'$ . В этом случае наблюдается сигнал свободной индукции, амплитуда которого пропорциональна величине  $M'_z$  в момент времени  $\tau$ . Измеряя зависимость амплитуды индуцированного сигнала от  $\tau$ , можно определить  $T_1$ . Амплитуда индуцированного сигнала связана с  $\tau$  зависимостью  $\ln(A_\infty - A_\tau) = \ln 2 A_\infty - \tau/T_1$ .

**Фурье-спектроскопия ЯМР.** При рассмотрении сигнала свободной индукции было отмечено, что сложная кривая спада этого сигнала несет в себе информацию о спектре ЯМР в частотной области. Это означает, что, регистрируя сигнал свободной индукции, можно по его виду реконструировать спектр ЯМР исследуемого вещества.

Если спектр поглощения описывается функцией  $f(\omega)$ , то, согласно преобразованию Фурье,  $f(\omega) = \text{const} \int_0^\infty f(t) \cos \omega t dt$ , где  $f(t)$  — функция, описывающая временную зависимость сигнала свободной индукции. На этом основана фурье-спектроскопия ЯМР.

Применение фурье-спектроскопии позволяет резко сократить время измерений. Для того чтобы зарегистрировать спектр ЯМР обычным способом, требуется произвести развертку по частоте в течение определенного промежутка времени. Для улучшения отношения сигнал/шум, часто применяют *метод накопления*. Сигнал ЯМР при этом многократно подается в память ЭВМ. После  $n$  про-

хождений спектра отношение сигнал/шум улучшается в  $\sqrt{n}$ . Все это, однако, требует длительного времени. Фурье-спектроскопия ЯМР позволяет снимать практически весь спектр сразу, что укорачивает время измерений в сотни и тысячи раз. Кроме того, использование фурье-спектроскопии позволяет исследовать короткоживущие соединения.

**Химический сдвиг.** Спектры ЯМР веществ в жидкостях или газах состоят из целого ряда линий, принадлежащих неэквивалентным ядрам. Это явление получило название *химического сдвига*. Причина его заключается в экранировании ядер электронами.

В постоянном магнитном поле электроны атома прецессируют относительно оси, проходящей через ядро и параллельной  $H_0$ . При этом создается магнитное поле, направленное противоположно  $H_0$  и пропорциональное ему по величине:  $H' = -\sigma H_0$ , где  $\sigma$  — константа экранирования. В силу этого атомные ядра находятся в эффективном поле:  $H_{эфф} = H_0 - \sigma H_0 = H_0(1 - \sigma)$ . Экранирование ядра электронами проявляется тем больше, чем больше электронов окружает ядро. В молекулах ситуация несколько сложнее: поле  $H' = -\sigma H_0$  на данном ядре в молекуле зависит от строения молекулы, ее ориентации относительно  $H_0$ ; следовательно, эффект экранирования имеет анизотропный характер.

Для измерения химического сдвига введены безразмерные единицы — миллионные доли ( $\delta$ , м. д.) от рабочей частоты спектрометра (или от напряженности  $H_0$ ):

$$\delta = (\Delta\nu/\nu_0) 10^6 = (\Delta H/H_0) 10^6,$$

где  $\Delta\nu$  ( $\Delta H$ ) — расстояние между данной линией и линией эталона, выраженное в Гц (или мТл).

Преимущества этих единиц заключаются в том, что значение  $\delta$  не зависит от внешнего поля. При измерениях химических сдвигов используют эталоны, например тетраметилсилан  $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$ . Все протоны в его молекуле эквивалентны, и потому его спектр

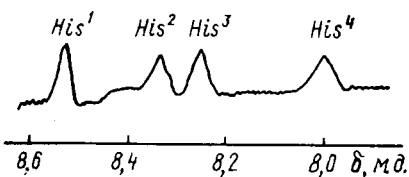


Рис. 116. Спектр ЯМР протонов гистидиновых остатков стафилококковой нуклеазы

Наличие четырех разрешенных линий означает различие в магнитном окружении протонов, что приводит к разнице в величине  $\sigma$

представляет одиночную узкую линию, далеко расположенную относительно других линий. Тетраметилсилан инертен, растворим во многих органических растворителях. Для водных растворов в качестве эталона используют 2,2-диметил-2-силанпентан-5-сульфонат натрия. Пример спектра ЯМР в шкале  $\delta$  приведен на рис. 116.

Возможность регистрировать хорошо разрешенные спектры ЯМР, особенно для таких боль-

ших молекул, как белки, появилась с созданием спектрометров ЯМР высокого разрешения. Расстояние между двумя линиями, выраженными в единицах частоты  $\Delta\nu$  или поля  $\Delta H$ , зависит от напряженности внешнего поля  $H_0$ . Чем выше напряженность, тем лучше разрешение. Относительное разрешение современных спектрометров, измеряемое как  $\Delta H/H_0$ , где  $\Delta H$  — неоднородность магнитного поля, составляет  $10^{-9}$  —  $10^{-10}$ ; рабочая частота спектрометров достигает 500 МГц. На рис. 116 представлен спектр ЯМР стафилококковой нуклеазы, полученный на приборе с рабочей частотой 220 МГц. Линии расположены в интервале 0,5  $\delta$ , однако хорошо разрешены.

**Спин-спиновое расщепление линий.** В разрешенных спектрах ЯМР часто наблюдается дополнительное расщепление линий, вызванное влиянием соседних ядер на данное ядро. Спин-спиновое взаимодействие ядер осуществляется через электроны химических связей. Спин-спиновое расщепление линий характеризуется константой спин-спинового взаимодействия  $J$ , которая измеряется как расстояние между соседними компонентами.

Примером спин-спинового взаимодействия служит расщепление линий в спектре ЯМР фтористоводородной кислоты HF. Магнитный момент протона ориентируется относительно внешнего поля параллельно или антипараллельно. В зависимости от ориентации протон по-разному поляризует электроны связи, что, в свою очередь, приводит к появлению на ядре F дополнительного поля  $\pm H_{\text{лок}}$ . Это и приводит к расщеплению линии F в дублет. Таким же образом расщепляется в дублет и линия протона. Число линий (*мультиплетность*) определяется числом ядер в соседней группе.

На рис. 117 представлен спектр ЯМР 1,1,2-трихлорэтана ( $\text{CHCl}_2$  —  $\text{CH}_2\text{Cl}$ ). Сигнал метиленовых протонов расщеплен на два пика, поскольку в соседней метиновой группе протон может быть ориентирован двумя способами. Сигнал протонов в метиновой группе расщеплен в триплет с соотношением интенсивностей 1:2:1 в соответствии с возможными спиновыми состояниями двух метиленовых протонов. Такая простая мультиплетность сигнала достигается не во всех случаях. Если  $J > 0$ ,  $1\Delta\nu$ , спектр ЯМР может сильно усложниться.

Константа  $J$  зависит от структуры фрагмента, включающего взаимодействующие ядра. Значение  $J$  уменьшается с ростом числа связей, разделяющих ядра. Спин-спиновое взаимодействие прото-

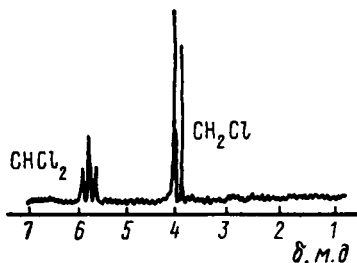


Рис. 117. Спектр ЯМР протонов трихлорэтана на частоте 60 МГц. Расщепления вызваны спин-спиновым взаимодействием магнитных моментов протонов метиновой и метиленовой групп.

нов проявляется через три связи, заметно ослабевая при четырех связях. Помимо этого значения  $J$  зависит и от геометрии связей между взаимодействующими ядрами. Константа  $J$  во фрагменте  $\begin{array}{c} \diagup \\ \text{CH} \\ \diagdown \end{array} - \text{HC} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array}$  меняется от 0 до 12 Гц в зависимости от угла поворота относительно связи С — С. Константа  $J$  максимальна при угле поворота  $180^\circ$  и минимальна при  $90^\circ$ .

**Применение ЯМР в биологии.** Применение ЯМР в биологических исследованиях стало возможным по мере совершенствования техники ЯМР, создания спектрометров ЯМР высокого разрешения. В настоящее время получены спектры ЯМР многих белков. Возможность регистрации хорошо разрешенных спектров ЯМР белков позволяет использовать ЯМР и для наблюдения за структурными изменениями, сопровождающими функционирование белков. Например, с помощью фурье-спектроскопии обнаружены два конформера цитохрома *c*, причем только один из них способен участвовать в переносе электрона. Методом ЯМР исследована структура нейротоксина из яда кобры. На основе этих данных построена частичная пространственная модель этого белка.

Метод ЯМР широко используют для изучения состояния воды в разнообразных биологических объектах. Показано, что вода в клетках может находиться в свободном и связанном состояниях. Эти состояния легко идентифицируются по временам  $T_1$  и  $T_2$ . С помощью метода ЯМР детально исследованы процессы набухания и прорастания семян.

В ряде работ обнаружены изменения  $T_1$  протонов воды в опухолевых тканях по сравнению со здоровыми, что представляет интерес в создании методов диагностики злокачественных заболеваний.

Помимо исследований протонного резонанса в биологических исследованиях применяют спектроскопию ЯМР и на других ядрах:  $^{13}\text{C}$  и  $^{31}\text{P}$ . Преимущества спектроскопии на ядрах  $^{13}\text{C}$  заключаются в том, что, во-первых, значения химических сдвигов расположены в более широкой области и, во-вторых, в спектрах отсутствует спин-спиновое взаимодействие из-за малого природного содержания углерода  $^{13}\text{C}$ . Это приводит к тому, что спектры ЯМР  $^{13}\text{C}$  имеют лучшее разрешение и более просты, что важно, особенно при исследовании больших белковых молекул.

ЯМР на ядрах  $^{31}\text{P}$  применяют для исследования поведения фосфолипидов в модельных и природных мембранах. В данном случае этот метод имеет даже некоторые преимущества по сравнению с методом спиновых зондов. Они заключаются в том, что исследуются непосредственно молекулы фосфолипидов, а не характеристики спинового зонда в системе. Помимо этого, спектроскопию на ядрах  $^{31}\text{P}$  применяют для изучения внутриклеточных фосфатов.

### § 3. Исследование биологических объектов методами гамма-резонансной спектроскопии

Открытие в 1958 г. Р. Мёссбауэром<sup>1</sup> нового физического явления — поглощения без отдачи  $\gamma$ -лучей — дало в руки исследователей мощный инструмент для исследования структуры и динамики кристаллов и макромолекул, обладающий энергетическим разрешением  $\sim 10^{-8}$  эВ. В опытах по  $\gamma$ -резонансу источниками излучения являются радиоактивные ядра. Состояния ядра с энергией, превышающей энергию основного (нижнего) состояния, являются нестабильными и могут спонтанно переходить в более низкие состояния с испусканием  $\gamma$ -кванта (рис. 118). Однако энергия  $\gamma$ -кванта  $\hbar\omega$  будет отлична от энергии перехода ( $\hbar\omega_e$ ) из-за эффекта отдачи. В простейшем случае свободного покоящегося ядра в силу закона сохранения импульса

$$\hbar k = \pm p, \quad (\text{VII.3.1})$$

где  $|k| = \omega/c$  — волновой вектор фотона,  $p$  — импульс отдачи ядра с массой  $M$ ;

$$\frac{p^2}{2M} + \hbar\omega = \hbar\omega_e. \quad (\text{VII.3.2})$$

Решая (VII. 3.2) и (VII.3.1) совместно, легко найти значения энергии  $\gamma$ -кванта и энергии отдачи  $p^2/(2M)$ . Как правило, энергия отдачи много меньше  $\hbar\omega_e$  и

$$p^2/(2M) \approx (\hbar\omega_e)^2/(2Mc^2),$$

где  $c \approx 3 \cdot 10^{10}$  см/с — скорость света. Рассмотрим типичный пример — переход с энергией  $\hbar\omega_e \approx 14$  кэВ в ядре  $^{57}\text{Fe}$ . В этом случае  $Mc^2 \approx 57 \cdot 10^8$  эВ и, следовательно,  $p^2/(2M) \approx 2 \cdot 10^{-8}$  эВ. Однако эта энергия не настолько мала, чтобы с ней не считаться при изучении процессов излучения и поглощения  $\gamma$ -квантов. Очевидно, что резонансное поглощение  $\gamma$ -кванта может произойти только в том случае, если энергия кванта с точностью до естественной ширины уровней совпадает с энергией ядерного перехода  $\hbar\omega_e$ .

Естественная ширина линии ядерного перехода определяется соотношением неопределенности, откуда  $\Gamma = \hbar/\tau$ ,

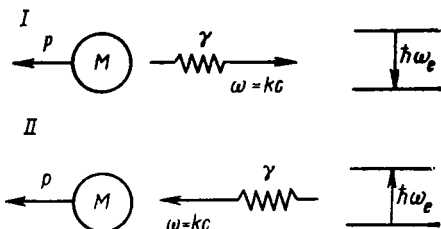


Рис. 118. Излучение (I) и поглощение (II)  $\gamma$ -кванта ядром:

$\hbar\omega_e$  — расстояние между энергетическими уровнями в ядре;  $p$  — импульс отдачи ( $p = \hbar\omega/c$ ); остальные объяснения см. в тексте

\* Р. Мёссбауэр в 1961 г. удостоен Нобелевской премии за открытие «эффекта Мёссбауэра», в 1982 г. избран иностранным членом АН СССР.

где  $\tau$  — время жизни рассматриваемого состояния. Обычно для  $\gamma$ -излучения  $\Gamma$  меньше  $10^{-6}$  эВ. Так, для  $^{57}\text{Fe}$   $\Gamma \approx 10^{-8}$  эВ. Иными словами, энергия отдачи  $p^2/(2M) \gg \Gamma$  и явление резонансного поглощения (и излучения) для свободных ядер невозможно (рис. 119) ввиду отсутствия перекрытия спектров излучения и поглощения соответственно.

Суть открытия Мёссбауэра состоит в том, что при определенных условиях ядра, включенные в кристаллическую решетку (или иную макромолекулярную систему, например белки), в процессе испускания (или поглощения)  $\gamma$ -квантов не испытывают отдачи и соответствующий спектр оказывается не смещенным по частоте относительно величины энергии перехода  $\hbar\omega_e$  (рис. 119, а). В этих условиях наблюдается резонансное поглощение невозбужденным ядром  $\gamma$ -кванта, испущенного другим, возбужденным, ядром. Природа этого эффекта заключается в том, что энергия отдачи может восприниматься не отдельным ядром, а всей макроскопической системой в целом. В этом случае в качестве массы  $M$  в (VII. 3.2) необходимо взять массу кристалла или макромолекулы и энергия отдачи оказывается пренебрежимо малой по сравнению с  $\Gamma$ .

Экспериментально  $\gamma$ -резонансные спектры наблюдают следующим образом (рис. 120). Имеются источник  $\gamma$ -излучения, поглотитель (излучаемый объект) и детектор-счетчик. Счетчик  $\gamma$ -квантов обычно состоит из сцинтиллирующего кристалла и фотоэлектронного умножителя, регистрирующего свечение, вызванное  $\gamma$ -квантами, прошедшими сквозь поглотитель. Например, в случае использования в качестве мёссбауэровских ядер  $^{57}\text{Fe}$ , включенных в состав изучаемого объекта, используют источник, содержащий  $^{57}\text{Co}$  с периодом полураспада 270 дней. Ядро  $^{57}\text{Co}$  испытывает  $K$ -захват и превращается в возбужденное ядро  $^{57}\text{Fe}$ , которое и является источником мёссбауэровского излучения. Для изменения энергии  $\gamma$ -кванта используется эффект Доплера. Сообщая образцу некоторую скорость  $v$  относительно источника, энергия  $\gamma$ -кванта изменяется на величину  $\Delta\hbar\omega = (v/c)\hbar\omega_e$ . Так как характерный диапазон

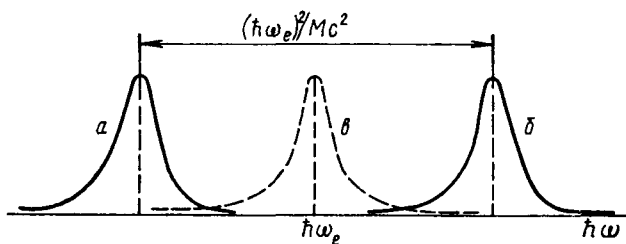


Рис. 119. Изменение спектров излучения (а) и поглощения (б) вследствие отдачи:

а — спектр излучения и поглощения без отдачи

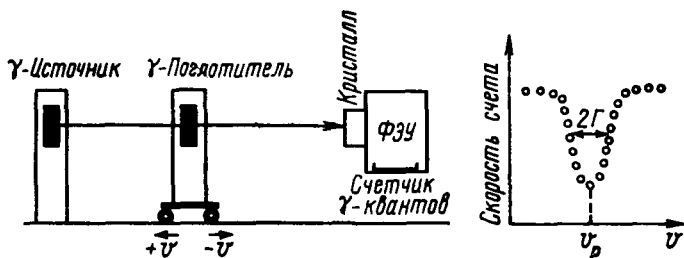


Рис. 120. Схема эксперимента для измерения мёссбауэровского спектра и схематический вид спектра:

ФЭУ — фотоэлектронный умножитель; остальные объяснения см. в тексте

изменения энергии имеет порядок ширины линии ( $\sim 10^{-8}$  эВ), то достаточно очень небольших изменений скорости ( $v$  порядка нескольких мм/с). В случае биологических объектов оказывается необходимым изучать также крылья мёссбауэровской спектральной линии и на современных установках диапазон скоростей варьируется до десятков см/с. Такие установки называются *скоростными спектрометрами*. Для создания доплеровских скоростей, модулирующих энергию  $\gamma$ -квантов, используют разнообразные механические и получившие наиболее широкое распространение электродинамические устройства. В зависимости от характера применяемого движения можно выделить две группы спектрометров. В первом случае движение образца происходит с постоянной скоростью, которая изменяется ступенями и спектр снимается по точкам. Этот тип спектрометра удобен для измерений малых сдвигов в положении резонансной линии и позволяет более детально исследовать отдельные участки спектра. Во втором случае задается периодическое движение с переменной скоростью и с помощью многоканального анализатора регистрируется интенсивность  $\gamma$ -излучения, соответствующая данной скорости. С выхода анализатора сигнал поступает на самописец, цифропечать или осциллограф. Этот спектрометр менее чувствителен к небольшой нестабильности регистрирующей аппаратуры, что важно в случае малоинтенсивных и сложных спектров.

Исключительно высокое энергетическое разрешение, достигаемое в мёссбауэровской спектроскопии, позволяет использовать этот эффект как весьма тонкий инструмент для анализа химического состояния мёссбауэровских ядер в образце. В биофизических исследованиях используют обычно изотоп  $^{57}\text{Fe}$  и основная масса результатов получена для железосодержащих белков: миоглобина, цитохрома  $c$ , ферредоксина, реакционных центров фотосинтезирующих бактерий и ряда других. В зависимости от электронного состояния мёссбауэровского атома и характера микроокружения наблюдаются сдвиг и расщепление  $\gamma$ -резонансных спектров.

**Химический сдвиг спектральной линии.** Этот сдвиг обусловлен кулоновским электрон-ядерным взаимодействием. Чем протяженнее распределение электрического заряда ядра и чем больше электронная плотность на ядре, тем больше полная энергия системы. Поэтому изменение размеров ядра при излучении  $\gamma$ -кванта вследствие разницы в электронном состоянии мёссбауэровского атома в излучателе и поглотителе приводит к химическому сдвигу спектральной линии:

$$\delta \sim (R_b - R_0) [|\psi(0)|_b^2 - |\psi(0)|_0^2],$$

где  $R_b$  и  $R_0$  — радиусы ядра в возбужденном и основном состояниях,  $|\psi(0)|_b^2$  и  $|\psi(0)|_0^2$  — плотность электронного облака на ядрах излучателя и поглотителя соответственно. Основной вклад в изменение  $|\psi(0)|^2$  дают  $s$ -электроны, и, сравнивая величину химического сдвига для различных соединений, можно оценивать валентное состояние мёссбауэровских атомов.

Другим источником информации об электронном состоянии мёссбауэровских атомов служит *квадрупольное расщепление спектральных линий*. Взаимодействие ядра, обладающего квадрупольным моментом  $Q$  (выражается в  $\text{см}^2$ ), с аксиально-симметричным неоднородным электрическим полем с градиентом напряженности  $q$  (выражается в  $\text{В/см}^2$ ) приводит к расщеплению уровня с моментом  $I$  на подуровни, отвечающие значениям магнитных квантовых чисел  $m = -I, -I + 1, \dots, +I$ .

Эти подуровни отличаются по энергии от первоначального значения энергии на величину

$$\Delta = W \frac{3m^2 - I(I+1)}{4I(2I-1)},$$

где  $W = eQq$  — константа квадрупольного взаимодействия (если  $e$  выражают в единицах заряда электрона, то  $W$  получается в эВ).

Необходимо отметить, что подуровни с магнитными числами  $\pm m$  остаются двукратно вырожденными, так как  $\Delta$  зависит от  $m^2$ . Ядра с полным моментом количества движения  $I$ , равным нулю и  $1/2$ , не обладают квадрупольным моментом, что является следствием общей теоремы, согласно которой порядок  $l$  мультипольного момента системы с полным моментом  $I$  не может быть больше  $2I$ . Вышесказанное можно пояснить на примере ядра  $^{57}\text{Fe}$ , которое в возбужденном состоянии обладает моментом  $I = 3/2$ , а в основном  $I = 1/2$ . Схема расщепления уровней показана на рис. 121. Верхний уровень расщепляется при этом на два подуровня:  $m \pm 3/2$  и  $m = \pm 1/2$ . Возникает дублет, в котором одна линия отвечает  $\sigma$ -переходу ( $\pm 1/2 \rightarrow \pm 1/2$ ), вторая —  $\pi$ -переходу ( $\pm 3/2 \rightarrow \pm 1/2$ ). Расстояние между этими линиями определяется суммой абсолютных величин  $\Delta$  для  $m = 3/2$  и  $m = 1/2$ :  $\Delta E = (1/2) W$ .

Наличие квадрупольного расщепления указывает на несимметричность окружения мёссбауэровского атома. Это расщепление



часто оказывается даже более чувствительным к природе химической связи (например, степени ее ионности), чем химические сдвиги мёссбауэровских спектров. Что касается соединений железа, то большие квадрупольные расщепления 2—2,5 мм/с наблюдаются только у двухвалентных ионов, тогда как для трехвалентного железа  $\Delta E$  на порядок меньше.

**Магнитное расщепление мёссбауэровских спектров.** В результате взаимодействия магнитного момента ядра с магнитным полем, создаваемым окружающими электронами или накладываемым от внешнего источника, происходит расщепление каждого из уровней с полным моментом  $I$  на  $2I + 1$  подуровней с магнитными квантовыми числами  $m = -I, -I + 1, \dots, +I$ . Величина смещения уровня с магнитным числом  $m$  относительно невозмущенного уровня определяется формулой

$$\Delta E_m = -(\mu/I) mH = -g_I \mu_N mH,$$

где  $H$  — напряженность магнитного поля,  $\mu$  — магнитный момент ядра,  $g_I = \mu / (I\mu_N)$  — ядерное гиромагнитное отношение, выраженное в ядерных магнетонах  $\mu_N$ . Картина зеемановского расщепления подуровней для ядра  $^{57}\text{Fe}$  показана на рис. 122.

Чтобы понять форму соответствующего  $\gamma$ -резонансного спектра, необходимо напомнить, что в дипольном приближении правилами отбора разрешены переходы с  $\Delta m = 0, \pm 1$ . Следовательно, в данном случае возникает шесть линий, причем спектр симметричен относительно частоты  $\omega_e$ . В тех случаях, когда источник и поглотитель представляют собой различные вещества, центр тяжести спектра находится не при скорости, равной нулю, а смещен на величину химического сдвига  $\delta$ . Гамма-резонанс дает очень удоб-

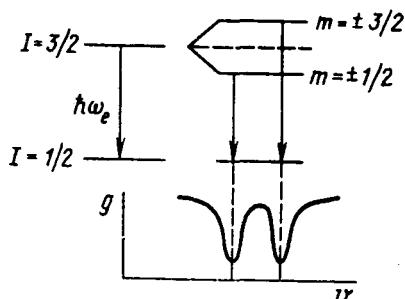


Рис. 121. Квадрупольное расщепление энергетических уровней ядра  $^{57}\text{Fe}$  и соответствующий вид мёссбауэровского спектра

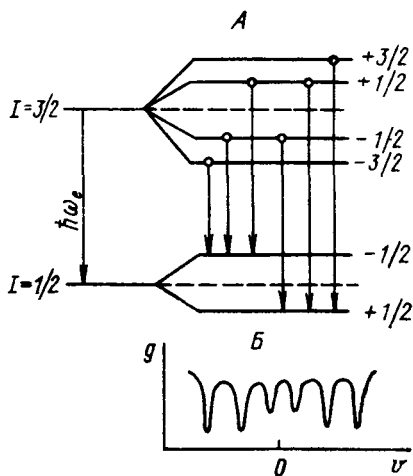


Рис. 122. Зеемановское расщепление уровней ядра  $^{57}\text{Fe}$  (А) и соответствующая форма мёссбауэровского спектра (Б)

ный и точный метод измерения эффективного магнитного поля, действующего на ядро. Величина поля, естественно, зависит от электронного состояния мёссбауэровского атома (суммарного электронного спина) и его микроокружения.

Таким образом, методы  $\gamma$ -резонансной спектроскопии позволяют весьма детально изучить состояние мёссбауэровских атомов в биобъектах. Применение этого метода часто ограничено лишь Fe-содержащими белками или биобъектами с введенными  $^{57}\text{Fe}$ -содержащими метками. Однако более 40 элементов имеют изотопы, пригодные для использования в качестве мёссбауэровских атомов.

Исследование химического состояния железосодержащих белков является, конечно, важным приложением мёссбауэровской спектроскопии. Вместе с тем в последние годы этот метод привлек большое внимание для изучения *внутренней динамики биомолекул*, поскольку амплитуда и форма мёссбауэровского спектра являются весьма чувствительными к зависимости среднеквадратичного смещения ядра от времени  $\langle [\Delta x(t)]^2 \rangle$ .

Согласно имеющейся теории, форма одиночной спектральной линии определяется интегралом:

$$g(\omega) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{+\infty} e^{-\frac{\Gamma}{2}|t|} e^{-i(\omega - \omega_0)t} \times \langle e^{ix(t)} e^{-ix(0)/\lambda} \rangle dt, \quad (\text{VII.3.3})$$

где  $\lambda = 2\pi\lambda$  — длина волны  $\gamma$ -излучения; в случае  $^{57}\text{Fe}$   $\lambda \approx 0,014$  нм;  $x(t)$  — положение мёссбауэровского ядра в момент  $t$ ; угловые скобки обозначают усреднение по ансамблю. Корреляционная функция Ван-Хова

$$\varphi(t) = \langle e^{ix(t)} e^{-ix(0)/\lambda} \rangle$$

в гауссовом приближении сводится к виду

$$\varphi(t) \approx e^{-\Gamma/(2\lambda^2) \langle [x(t) - x(0)]^2 \rangle}$$

Рассмотрим несколько хорошо известных случаев. Если ядро жестко закреплено и неподвижно, то  $\varphi(t) = 1$  и спектр описывается лоренцевской линией с естественной шириной  $\Gamma$ :

$$g_L(\omega) = \frac{\Gamma/(2\pi)}{(\omega - \omega_0)^2 + \Gamma^2/4}$$

Если ядро свободно диффундирует в жидкости, то

$$\langle [x(t) - x(0)]^2 \rangle = 2D|t|,$$

где  $D$  — коэффициент диффузии, обратно пропорциональный вязкости жидкости. Легко видеть, что в этой ситуации должен наблюдаться лоренцевский спектр с шириной  $\tilde{\Gamma} = \Gamma + 2D/\lambda^2$ . При значениях вязкости жидкостей  $\eta \ll 10^3$  Па·с (вязкость  $\text{H}_2\text{O} \sim 10^{-1}$  Па·с, глицерина  $\sim 1,0$  Па·с при  $T = 300$  К) диффузионная до-

бавка к ширине линии столь велика, что спектр практически не наблюдается. При замораживании системы коэффициент диффузии экспоненциально уменьшается  $D = D_0 e^{-\epsilon/(kT)}$ , линия сужается и ее амплитуда возрастает. В случае твердых тел, если моделировать колебания ядра в узле кристаллической решетки гармоническим осциллятором с частотой  $\omega_0$  и коэффициентом затухания  $\gamma/M$  ( $\gamma M \ll \ll \omega_0$ , где  $\gamma$  — эффективный коэффициент трения),

$$\langle [x(t) - x(0)]^2 \rangle = 2x_a^2 [1 - e^{-[\gamma/(2M)] |t|} \cos \omega_0 t],$$

где  $x_a^2$  — среднеквадратичная амплитуда колебаний:

$$x_a^2 = kT / (M\omega_0^2). \quad (\text{VII.3.4})$$

Скорость затухания в случае твердых тел  $\gamma/M \approx 10^{11} \div 10^{12} \text{с}^{-1}$ , а  $\omega_0 \sim 10^{13} \text{с}^{-1}$ . В этом случае вычисление интеграла (VII.3.3) показывает, что в доступной области скоростей  $v$  спектр является лоренцевским с шириной  $\Gamma$  и амплитудой

$$f' = e^{-x_a^2/\lambda^2},$$

т. е.  $g(\omega) = f' g_L(\omega)$ . Величина  $f'$  определяет вероятность эффекта Мёссбауэра и называется *фактором Лэмба — Мёссбауэра* (или Дебая — Валлера). Обычно эту величину определяют как площадь под экспериментальным спектром.

В случае биомакромолекул динамика системы отличается как от жидких, так и от твердых тел и может быть приближенно описана броуновским осциллятором с сильным затуханием. Среднеквадратичное смещение в этом случае описывается формулой

$$\langle [x(t) - x(0)]^2 \rangle = 2x_a^2 (1 - e^{-t/\tau_c}), \quad (\text{VII.3.5})$$

где  $\tau_c = \gamma / (M\omega_0^2)$  — время релаксации конформационных движений. Коэффициент трения  $\gamma$  соотношением Стокса — Эйнштейна связан с микровязкостью системы  $\eta$ :

$$\gamma \simeq 6\pi r \eta, \quad (\text{VII.3.6})$$

где  $r$  — характерный размер белковой группы, с которой жестко связан мёссбауэровский атом. Коэффициент  $\gamma$  может быть также пересчитан на коэффициент диффузии по конформационным подсистемам:

$$D = kT/\gamma. \quad (\text{VII.3.7})$$

Вычисление интеграла (VII.3.3) показывает, что в случае белков форма мёссбауэровского спектра определяется формулой

$$g(\omega) = f' g'(\omega) + g''(\omega), \quad (\text{VII.3.8})$$

где  $g'(\omega)$  — линия с шириной порядка  $\Gamma$ , мало изменяющейся при увеличении температуры;  $g''(\omega)$  — широкая линия, быстро сливающаяся с фоном. Вероятность  $f'$  зависит как от  $x_a^2$ , так и от времени релаксации  $\tau_c$ :

$$f' = 1 - a^2 e^{-a^2} \int_0^1 y^{(\Gamma/2)\tau} e^{a^2 y} dy, \quad (\text{VII.3.9})$$

где введено обозначение  $a^2 = x_a^2/\lambda^2$ .

При температурах ниже точки перегиба зависимости  $f'(T)$  для практических расчетов полезна асимптотика

$$f' \sim [1 + 2a^2/(\Gamma\tau)]^{-1}; \quad \Gamma\tau \gg 1.$$

Добавка  $g''(\omega)$  учитывает быстро уширяющиеся компоненты спектра и наблюдается только в прецизионных измерениях. На рис. 123 сравниваются характерные температурные зависимости вероятности  $f'$  и полуширины линии в разобранных выше трех случаях. Быстрое падение фактора  $f'$  для белков при температурах выше 250 К связано не с увеличением амплитуды движения  $x_a$ , а с быстрым уменьшением времени релаксации ниже значений  $\Gamma^{-1}$  (т. е. времени жизни мёссбауэровского ядра).

Анализ мёссбауэровских спектров для биомакромолекул позволяет получить важную информацию о молекулярной динамике этой системы и благодаря очень высокому разрешению метода определить параметры  $\tau_c$  и  $x_a^2$ . По этим значениям можно вычислить эффективные коэффициенты жесткости для конформационных мод и микрвязкость системы.

В варианте релеевского рассеяния мёссбауэровского излучения (РРМИ) при изучении динамики молекул присутствие ядер  $^{57}\text{Fe}$  в образце не обязательно, так как рассеяние  $\gamma$ -квантов идет с достаточной эффективностью на атомах С, N и O. В этом варианте величина  $1/\lambda$  в предыдущих формулах должна быть заменена на  $Q = |\mathbf{k} - \mathbf{k}_0|$ , где  $\mathbf{k}_0$  — волновой вектор падающего  $\gamma$ -кванта, а  $\mathbf{k}$  —

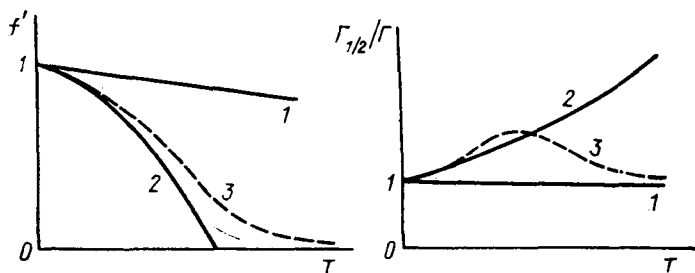


Рис. 123. Характерные температурные зависимости вероятностей эффекта Мёссбауэра ( $f'$ ) и эффективной полуширины линии ( $\Gamma$ ) в случае твердых (1), жидких (2) тел и белков (3)

рассеянного. Изменяя угол регистрации  $\gamma$ -квантов можно варьировать величину  $Q$ , которая обычно составляет порядка  $0,1 \text{ нм}^{-1}$ . Естественно, что в опытах по рэлеевскому рассеянию изучается усредненная по всем атомам динамика образца. Однако эти данные весьма важны для биофизики, так как растормаживание молекулярной подвижности обуславливает в большом числе случаев и увеличение функциональной активности белков.

Рассмотрим конкретные примеры по определению динамических параметров молекулярных систем.

**Пример 1.** При исследовании высушенных препаратов хроматофоров, меченных  $^{57}\text{Fe}$ , обнаружили, что с увеличением температуры вероятность эффекта Мёссбауэра плавно уменьшается, причем ширина спектра при этом практически не меняется. Тангенс угла наклона зависимости  $-\ln f'$  от температуры при  $T > 200 \text{ К}$  имеет практически постоянное значение  $\sim 1,53 \times 10^{-3} \text{ К}^{-1}$ . Определить константу упругости валентных колебаний атома железа.

*Решение.* Так как форма спектра практически не изменяется, то уменьшение фактора  $f'$  связано только с увеличением амплитуды колебаний железа в порфириновом комплексе. Согласно формуле Дебая — Валлера

$$f' = e^{-x_a^2/\lambda^2},$$

где  $x_a^2$  — средний квадрат амплитуды колебаний при температуре  $T$ .

Согласно теореме о равнораспределении энергии по степеням свободы, средняя энергия осциллятора  $\langle E \rangle = kT$ . Так как  $E = Mv^2/2 + (1/2)Kx^2$  и для осциллятора средняя кинетическая энергия равна средней потенциальной энергии, то получаем  $\langle (1/2)Kx^2 \rangle = (1/2)kT$  или  $x_a^2 = \langle x^2 \rangle = kT/K$ . Для  $^{57}\text{Fe}$   $\lambda \approx 0,014 \text{ нм}$ . Следовательно,

$$-\ln f' = \frac{1,38 \cdot 10^{-5}}{(0,014)^2 K} T = \frac{7,04 \cdot 10^{-2}}{K} T,$$

т. е.  $\frac{70,4}{K} \approx 1,53$ ;  $K \approx 46 \text{ Н/м}$ .

**Пример 2.** При исследовании растворов миоглобина в вязкой среде, содержащей поливиниловый спирт, было обнаружено, что с увеличением температуры происходит уширение мёссбауэровских спектров. Ниже  $180 \text{ К}$  эффективная ширина спектра мало отличается от естественной ширины линии, равной  $0,7 \cdot 10^4 \text{ с}^{-1}$ . При  $206 \text{ К}$  ширина спектра в два раза больше, при  $217$  — в 3, при  $223$  — в 4, при  $226$  — в 5, при  $243$  — в 11, при  $255$  — в 21 раз больше естественной ширины. Определить энергию активации диффузии миоглобина в растворе и ожидаемую вязкость системы при  $300 \text{ К}$ .

*Решение.* Так как имеет место сильное уширение мессбауэровской линии, то происходит диффузия молекул миоглобина как целого. Ширина линии связана с коэффициентом диффузии соотношением

$$\tilde{\Gamma} = \Gamma + 2D/\lambda^2 = \Gamma + \Delta\Gamma.$$

Коэффициент диффузии  $D = D_0 e^{-\epsilon/(kT)}$ .

Вязкость раствора связана с  $D$  соотношением Стокса — Эйнштейна

$$6\pi\eta_S = kT/D.$$

Полезным является соотношение

$$\frac{\Delta\Gamma}{\Gamma} \approx \frac{120\Gamma \text{ (К)}}{\eta_S \text{ (Па}\cdot\text{с)} r \text{ (нм)}}.$$

Из зависимости  $\ln\Delta\Gamma(T)$  находим, что  $\varepsilon \approx 25$  кДж/моль. Полагая  $r \sim 2,5$  нм, имеем  $\eta_S \approx 4,5 \cdot 10^{-3} e^{+3000/T}$  Па·с. При  $T = 300$  К  $\eta_S = 100$  Па·с.

**Пример 3.** Исследование влажных препаратов хроматофоров, обогащенных  $^{57}\text{Fe}$ , методами мёссбауэровской спектроскопии показало, что в области температур 200—250 К наблюдается резкое уменьшение фактора  $f'$ , не сопровождающееся заметным уширением спектра. При  $T > 250$  К зависимость  $-\ln f'(T)$  является практически линейной с тангенсом угла наклона  $\sim 10^{-2}$  К $^{-1}$ . В области температур 200—240 К зависимость  $\ln(1/T)(1/f' - 1)$  линеаризуется в аррениусовских координатах и представляет собой линейную функцию вида  $6,67 - 2500/T$ . Определить константу жесткости для конформационных движений и значения микровязкости и времени релаксации при 300 К.

**Решение.** Резкое уменьшение вероятности эффекта Мёссбауэра без значительного уширения линии характерно для систем с конформационной подвижностью, происходящей по законам ограниченной диффузии. Вероятность эффекта в этом случае описывается формулой

$$f' = 1 - a^2 e^{-a^2} \int_0^1 y^{\Gamma\tau_c/2} e^{a^2 y} dy,$$

где  $a^2 = x_a^2/\lambda^2 = kT/(K\lambda^2)$ ,

$$\tau_c = \gamma/K = 6\pi r\eta/K$$

— время релаксации, определенное в предыдущей задаче;  $\Gamma = 0,7 \cdot 10^7$  с $^{-1}$ .

При больших  $T$   $f'$  описывается выражением Дебая — Валлера:  $f' = e^{-a^2}$ .

$$k/(K\lambda^2) \approx 10^{-2}; \quad \frac{1,38 \cdot 10^{-5}}{K(0,014)^2} \approx 10^{-2},$$

$$K \approx 7 \text{ Н/м.}$$

При низких температурах для  $f'$  имеет место асимптотика:

$$f' = 1 / \left( 1 + \frac{2a^2}{\Gamma\tau} \right) \text{ или } \ln(1/T)(1/f' - 1) = \ln\left( \frac{k}{3\pi\lambda^2 \Gamma r \eta_0} \right) - \frac{\varepsilon}{kT},$$

где  $r \approx 0,5$  нм — радиус движущейся группы,  $\eta = \eta_0 e^{\varepsilon/kT}$  — микровязкость системы.

Из условия задачи  $\varepsilon \approx 21$  кДж/моль и  $\ln \frac{21,3}{\eta_0} = 6,67$ . Следовательно,  $\eta = 0,27 e^{2500/T}$  или  $\eta(300) \approx 1120$  Па·с. Отсюда вычисляют время релаксации:  $\tau = \frac{6\pi r\eta}{K} \approx \frac{20 \cdot 5 \cdot 10^{-10} \cdot 10}{7} \approx 0,14 \cdot 10^{-7}$  с.

В этих примерах показано, как провести приближенные оценки динамических параметров. Более детальная информация может быть получена при обработке спектров с помощью ЭВМ.

#### § 4. Обработка мёссбауэровских спектров на ЭВМ

Метод мёссбауэровской спектроскопии и РРМИ являются эффективными способами исследования динамики молекулярных систем. В отличие от других методов, позволяющих исследовать динамику движения атомов в молекуле (ЯМР, ЭПР и др.), мёссбауэровские измерения несут информацию как о характерных временах движения атомов (более быстрых, чем  $10^{-8}$ с), так и о масштабах этих движений. Особенно ценным мёссбауэровский подход оказался для исследования внутримолекулярной динамики гемсодержащих белков. С его помощью удалось определить такие динамические характеристики, как внутрибелковая микровязкость, модуль Юнга белковой молекулы и среднеквадратичные смещения атомов белка. Эти параметры получены из экспериментально измеренных факторов Лэмба — Мёссбауэра в рамках модели броуновского осциллятора с сильным затуханием (VII.3.5) — (VII.3.9).

Как следует из (VII.3.9), фактор Лэмба — Мёссбауэра пропорционален интенсивности узкой линии (с шириной порядка  $\Gamma$ ) в случае представления спектральной линии (VII.3.3) суммой двух функций Лоренца. Поэтому необходима процедура, позволяющая разлагать экспериментальную спектральную линию на две составляющие: узкую лоренцевскую линию и широкую линию, описываемую формулой Лоренца с шириной много больше  $\Gamma$ . Реальная ситуация осложняется вдобавок тем, что в эксперименте измеряется не сама спектральная линия, а разность между экспериментальным фоном и спектральной линией (типичный график представлен на рис. 124). По оси абсцисс на этом графике отложена относительная скорость между источником и детектором  $\gamma$ -квантов, по оси ординат — количеству зарегистрированных  $\gamma$ -квантов со сдвигом частоты, соответ-

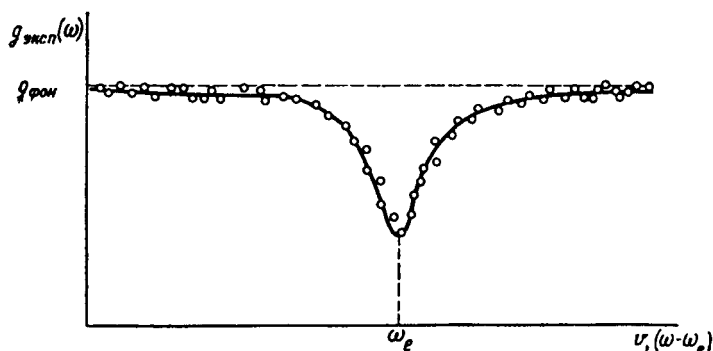


Рис. 124. Типичный вид спектра, получаемого в экспериментах по мёссбауэровской спектроскопии и РРМИ (остальные объяснения см. в тексте)

ствующим скорости  $v$ . Таким образом, в эксперименте измеряется величина

$$g_{\text{эксп}}(\omega) = g_{\text{фон}} - g(\omega), \quad (\text{VII.4.1})$$

где  $g_{\text{фон}}$  — значение экспериментального фона,  $g(\omega)$  — спектральная мёссбауэровская линия. При сильных расстройках частоты  $|\omega - \omega_e| \gg \Gamma$  (при больших относительных скоростях источника и детектора  $\gamma$ -квантов  $g(\omega) \rightarrow 0$ ). Разложение спектральной линии на сумму двух функций Лоренца имеет вид

$$g^{(1)} = \alpha \frac{1}{\pi} \frac{\gamma_1}{(\omega - \omega_e)^2 + \gamma_1^2} + \beta \frac{1}{\pi} \frac{\gamma_2}{(\omega - \omega_e)^2 + \gamma_2^2}, \quad (\text{VII.4.2})$$

где  $\gamma_1 \approx \Gamma/2$  — полуширина узкой линии;  $\gamma_2 > \Gamma/2$  — полуширина широкой линии;  $\alpha$  и  $\beta$  — интенсивность узкой и широкой линий соответственно,  $\omega$  — частота  $\gamma$ -квантов,  $\omega_e$  — резонансная частота. В качестве  $g(\omega)$  можно также взять спектральную функцию для броуновского гармонического осциллятора с сильным затуханием:

$$g^{(2)}(\omega) = \frac{\alpha}{\pi} \int_0^{\infty} e^{-\frac{\Gamma t}{2} - \frac{x_a^2}{\lambda^2} (1 - e^{-t/\tau_c})} \cos[(\omega - \omega_e)t] dt, \quad (\text{VII.4.3})$$

где  $\alpha$  — коэффициент пропорциональности,  $\Gamma$  — естественная ширина мёссбауэровской линии, параметры  $x_a^2$  и  $\tau_c$  определяются формулами (VII.3.4) и (VII.3.5). Итак, встает задача нахождения из экспериментальных мёссбауэровских спектров набора параметров  $\{g_{\text{фон}}, \alpha, \gamma_1, \beta, \gamma_2, \omega_e\}$  при представлении  $g(\omega)$  формулой (VII.4.2). В случае использования для  $g(\omega)$  формулы (VII.4.3) необходимо найти  $\{g_{\text{фон}}, \alpha, \Gamma, x_a^2, \tau_c, \omega_e\}$ . Определение этих параметров производится методом наименьших квадратов. Введем следующую функцию:

$$S(\{\alpha_i\}) = \sum_{i=1}^{N_{\text{эксп}}} (g_{\text{эксп}}(\omega_i) - (g_{\text{фон}} - g(\omega_i)))^2, \quad (\text{VII.4.4})$$

где через  $\{\alpha_i\}$  обозначен набор искомых параметров,  $N_{\text{эксп}}$  — число точек экспериментального спектра (обычно оно составляет несколько сотен).  $g_{\text{эксп}}(\omega)$  — экспериментальное значение спектра при расстройке частоты  $\omega_i$ . Естественно, что чем меньше величина  $S$ , тем точнее описан экспериментальный спектр. Набор параметров  $\{\alpha\}$ , при котором функция  $S$  достигнет минимума, будет наилучшим способом описывать спектр, и его можно принять для последующей теоретической обработки.

Нахождение минимума функции  $S$ , зависящей от шести переменных, относится к классу задач поиска экстремума функций многих переменных. В вычислительной математике разработано боль-



шое количество методов поиска экстремума. Удобным методом для нахождения минимума функции  $S$  является *метод сопряженных градиентов*. Суть его состоит в следующем. Пусть необходимо найти минимум функции  $f(x)$ , зависящей от нескольких переменных  $x$ . Выберем в качестве начальной точку  $x^{(0)}$ . Вычислим в этой точке  $\nabla f(x^{(0)})$ . В качестве следующей точки возьмем

$$x^{(1)} = x^{(0)} + \lambda^{*(0)} S^{(0)}; \quad S^{(0)} = -\nabla f(x^{(0)}). \quad (\text{VII.4.5})$$

Число  $\lambda^{*(0)}$  находят из требования, чтобы функция  $f(x)$  имела в направлении, определяемом вектором  $S^{(0)}$ , минимум (предполагают, что он достигается при  $\lambda = \lambda^{(0)}$ , т. е.  $x = x^{(1)}$ ). После этого вычисляют следующую величину:

$$\omega_1 = \frac{\nabla^T f(x^{(1)}) \nabla f(x^{(1)})}{\nabla^T f(x^{(0)}) \nabla f(x^{(0)})}; \quad \nabla^T f(y) \nabla f(y) = \sum_{i=1}^k \left( \frac{\partial f}{\partial f_i} \right) \quad (\text{VII.4.6})$$

где  $k$  — число переменных функций  $f$ , по которым производится минимизация. С помощью  $\omega_1$  находят новое направление поиска:

$$S^{(1)} = -\nabla f(x^{(1)}) + S^{(0)} \omega_1. \quad (\text{VII.4.7})$$

Проводят поиск минимума в направлении  $S^{(1)}$ , определяют точку  $x^{(2)}$  и т. д. Рекуррентное соотношение для метода сопряженных градиентов следующее:

$$x^{(k+1)} = x^{(k)} + \lambda^k S^{(k)}; \\ S^{(k+1)} = -\nabla f(x^{(k+1)}) + S^{(k)} \omega_k. \quad (\text{VII.4.8})$$

После  $(k+1)$ -итерации эта процедура циклически повторяется с заменой  $x^{(0)}$  на  $x^{(k+1)}$ . Поиск минимума прекращается при выполнении условия  $\sqrt{\overline{S^2}} < \varepsilon$ , где  $\varepsilon$  много меньше единицы. Одномерный поиск минимума функции  $f(x)$  в каком-либо направлении  $S$  удобно проводить методом кубической интерполяции.

Пусть требуется определить минимум функции  $\varphi(x)$ , зависящей от одной переменной  $x$ . Для этой функции известны ее значения на концах некоторого отрезка  $[a, b]$  —  $\varphi(a)$  и  $\varphi(b)$ , первые производные в точках  $a$  и  $b$ :  $\varphi'(a)$  и  $\varphi'(b)$  [для определенности положим  $\varphi'(a) < 0$ ,  $\varphi'(b) > 0$ ]. Тогда на этом отрезке функцию  $\varphi(x)$  можно аппроксимировать кубической параболой, имеющей минимум в точке:

$$\tilde{x} = b \frac{-(z + \varphi'(b) - \omega) \lambda}{\varphi'(b) + \varphi'(a) + 2z}; \quad \lambda = b - a; \\ z = \frac{3[\varphi(a) - \varphi(b)]}{\lambda} + \varphi'(a) + \varphi'(b); \\ \omega = \sqrt{z^2 - \varphi'(a)\varphi'(b)}. \quad (\text{VII.4.9})$$

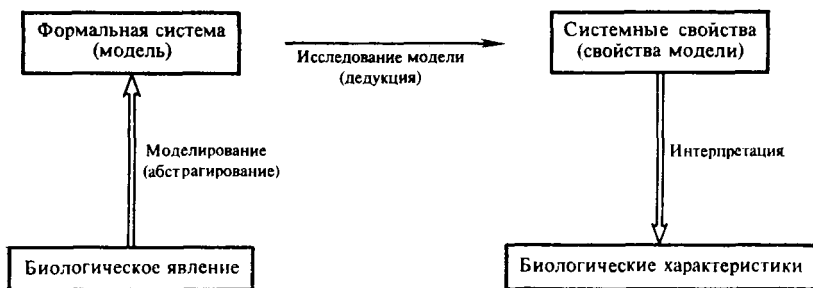
Если  $|\varphi'(\tilde{x})| < \varepsilon_2$ , где  $\varepsilon_2$  — малое число, то поиск корня прекращается, в противном случае точка  $\tilde{x}$  становится одним из краев отрезка, внутри которого ищется минимум, и вычисления (VII. 4.9) повторяются.

Использование метода сопряженных градиентов для нахождения набора параметров, минимизирующих функцию  $S$ , удобно по двум причинам: достаточно просто вычислить первые производные функции  $S$  по параметрам  $\{\alpha_i\}$ , и этот метод быстро сходится, т. е. минимум функции  $S$  определяется после не очень большого числа итераций (VII. 4.8).

Задача нахождения минимума функции  $S$  по изложенному выше алгоритму может выполняться на ЭВМ. На кафедре биофизики Биологического факультета МГУ созданы программы, решающие поставленную задачу путем разложения экспериментального мёсбауэровского спектра на две функции Лоренца с последующим определением фактора Лэмба — Мёсбауэра и подгонки экспериментального спектра функцией броуновского осциллятора с целью определения параметров  $x_a^2$  и  $\tau_i$ . Эти программы написаны на языке ФОРТРАН-IV, адаптированы для операционных систем ОС РВ и RSX и используются при обработке экспериментальных спектров.



### Схема VIII.1.1. Системный подход в моделировании биологического объекта



к изучению ее свойств методами математической дедукции или путем машинного моделирования.

Выбор математического аппарата для модели определяют не только экспериментальными условиями и свойствами биологического объекта, но и наличием математических результатов, которыми можно воспользоваться при рассмотрении тех или иных свойств объекта. Например, если исследуют устойчивость, то удобно задать модель системы в виде дифференциальных или разностных уравнений. Если изучают проблемы декомпозиции и нахождения подсистем, предпочтительными могут оказаться некоторые алгебраические модели. Когда система может находиться в нескольких дискретных состояниях, способных переходить друг в друга, удобно изобразить эти состояния в виде графа, а переходы между ними описывать при помощи вероятностной теории марковских процессов. В любом случае задачей исследования является отыскание связи между измеряемыми переменными.

При изучении закономерностей биологического явления обычно предлагают несколько альтернативных моделей. Проверяют *качественное* соответствие этих моделей объекту. Например, устанавливают наличие устойчивых стационарных состояний в модели, существование колебательных или триггерных режимов. Модель, наилучшим образом соответствующую исследуемой биологической системе, выбирают в качестве *базовой*. Затем выбранную модель уточняют применительно к конкретной исследуемой системе и проводят идентификацию параметров этой модели, т. е. определение числовых значений параметров по экспериментальным данным (схема VIII. 1.2).

Блок 1 соответствует имеющимся к началу исследования данным об изучаемом объекте или проведению некоторого затравочного эксперимента, который позволяет получить «грубую» информацию о процессе.

В блоке 2 осуществляется выбор базовой модели из возможных альтернативных моделей по качественным признакам. Для дальнейшего исследова-

ния отбирают тот функциональный вид модели, который способен наилучшим образом описать имеющиеся экспериментальные данные (полученные в блоке 1).

Этап 3 представляет вычисление оценок параметров, выбранных в блоке 2 модели. На этом этапе производится идентификация параметров модели по экспериментальным данным.

Блок 4 осуществляет верификацию, т. е. проверку поведения модели на независимых экспериментальных данных. Для этого часто приходится ставить дополнительные эксперименты. В зависимости от обстоятельств исследование либо можно считать законченным, либо продолжать эксперименты по уточнению всей совокупности или наиболее интересной для исследователя группы параметров (блок 5).

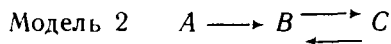
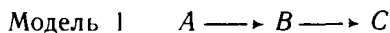
Если взятые для верификации модели экспериментальные данные «не вписываются» в модель, требуется проанализировать ситуацию и выдвинуть иные по сравнению с первоначальной модели, исследовать свойства этих новых моделей, а затем поставить эксперименты, позволяющие сделать вывод о предпочтительности одной из них (блок 6).

При разработке математического описания какого-либо биологического процесса исследователь может столкнуться с ситуацией, когда имеющимся экспериментальным данным удовлетворяют две (или более) различные математические модели. Прежде чем перейти к дальнейшей работе, например уточнению параметров, необходимо

Схема VIII.1.2. Последовательный процесс поиска математической модели



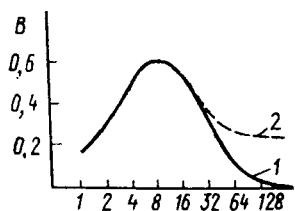
сделать выбор между этими моделями. Для того чтобы поставить дискриминирующий эксперимент, необходимо исследовать модели и найти такие их свойства, которые бы отличались для двух моделей. Если речь идет о регистрации кинетических кривых, нужно найти такие точки, результаты измерений в которых не были бы инвариантны относительно замены одной проверяемой модели на другую, например химическая реакция, в которой вещество  $A$  используется для получения продукта  $B$ . Пусть реакция может быть одного из двух видов с обратимой или необратимой последней стадией:



Типичные кривые, показывающие зависимость концентрации продукта как функции времени, показаны на рис. 125. Ясно, что, для того чтобы выявить, какая из моделей верна, бессмысленно производить измерения в области  $t \leq 10$  мин, необходимы большие времена. Однако при слишком больших временах работать бывает экономически невыгодно, поэтому необходим поиск компромиссного решения; в данном случае пригодно  $t \sim 100$  мин.

Процесс поиска адекватной модели не может быть полностью формализован. На всех этапах, в особенности на этапе выбора альтернативной модели и постановки дискриминирующего эксперимента, успех исследования во многом зависит от опыта и интуиции специалиста и каждая научная проблема решается по-своему. Однако два момента в сложном пути исследования, изображенном на схеме VIII.1.2, имеют сейчас достаточно развитый формальный математический аппарат, который необходимо научиться применять, чтобы успешно решать задачу математического моделирования биологических систем.

1. *Качественная теория* дифференциальных и разностных уравнений, позволяющая установить качественные черты поведения



Время, логарифмическая шкала

Рис. 125. Концентрация продукта  $B$  как функция времени для механизма реакции  $A \rightarrow B \rightarrow C$  (1) и механизма  $A \rightarrow B \rightleftharpoons C$  (2)

предлагаемых моделей: возможность устойчивых стационарных состояний, колебательных, триггерных и квазистochasticеских режимов, бифуркационные свойства модели в различных областях параметров и пр. Этой теорией необходимо владеть при выборе альтернативных моделей. В качестве примера применения качественных методов может быть выбрана любая модель биологического процесса, сводимая к системе из одного или двух дифференциальных уравнений. Ниже (см. § 2, 3 этой главы) разобраны два примера: модель роста

биологической популяции в ограниченной среде и математическая модель переноса электрона в фотосинтетической электрон-транспортной цепи (ЭТЦ).

2. *Теория идентификации* параметров динамических систем, применение методов которой позволяет во многих случаях достаточно точно (иногда однозначно) оценить числовые значения параметров предлагаемых моделей.

## § 2. Рост биологической популяции в условиях ограниченности ресурсов. Непрерывное и дискретное описание

Основным свойством живых организмов является их способность к росту и размножению. Большинство моделей биологических процессов самого разного уровня сложности содержит описание динамики популяций (популяций клеток — на уровне организмов и тканей, популяций растений или животных — на экологическом уровне). Здесь рассмотрены методы качественного и машинного исследования непрерывной и дискретной моделей популяции в ограниченной среде.

Уравнение, описывающее динамику численности популяции, можно записать в общем виде:

$$\dot{x} = F(x), \text{ или } \dot{x} = xf(x). \quad (\text{VIII.2.1})$$

Изменение численности складывается из двух процессов: размножения и гибели особей. Если их рассматривать порознь, уравнение (VIII. 2.1) приобретает вид  $\dot{x} = B(x) - D(x)$  или  $\dot{x} = x[b(x) - d(x)]$ . Здесь  $B(x)$  и  $D(x)$  — абсолютные скорости рождения и гибели особей,  $b(x)$  и  $d(x)$  — соответствующие удельные скорости, отнесенные к общей численности популяции (плодовитость и смертность). Если плодовитость и смертность не зависят от численности популяции, что наблюдается, например, при размножении путем деления, получают уравнение экспоненциального роста популяции:

$$\dot{x} = (b - d)x = ax. \quad (\text{VIII.2.2})$$

Динамика численности такой популяции представлена на рис. 126 (кривые 1). Очевидно, что беспредельный рост популяций, описанный выше, невозможен из-за ограниченности внешних ресурсов популяции: источников пищи, мест обитания и т. п. Ограниченность внешних ресурсов приводит к внутривидовой конкуренции, вследствие которой плодовитость с ростом плотности популяции падает, а смертность возрастает. Наиболее простым и подтвержденным во многих случаях экспериментально является предположение о линейном характере этих зависимостей. Обозначая через  $b_0(x)$  и  $d_0(x)$  зависимость плодовитости и смертности от плотности в сво-

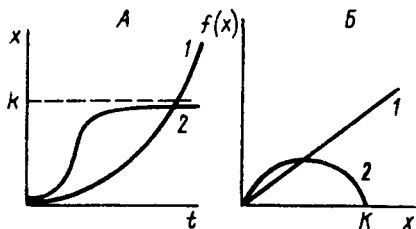


Рис. 126. Динамика численности популяции для моделей экспоненциального (1) и логарифмического (2) роста. А — зависимость численности от времени; Б — зависимость скорости роста от численности

бодной популяции, а теми же буквами без индекса — аналогичные величины в ограниченной ресурсами популяции, можно записать:

$$b(x) = b_0(x) - l_b(x); \quad d(x) = d_0(x) - l_d x.$$

Здесь  $l_{b,d}$  — коэффициенты пропорциональности, характеризующие влияние конкуренции на плодовитость и смертность. Общее уравнение динамики численности с учетом внутривидовой конкуренции принимает вид

$$\dot{x} = x [b_0(x) - d_0(x) - l_b x] = B_0(x) - D_0(x) - l x^2 = F_0(x) - l x^2.$$

Учет ограниченности ресурсов превращает уравнение (VIII. 2.2) в известное логистическое уравнение Ферхюльста — Пирла:

$$\dot{x} = ax - lx^2 = ax(K - x); \quad K = l/a \quad (\text{VIII.2.3})$$

$$\text{или } \dot{x} = rx(1 - x/K); \quad r = aK,$$

где  $r$  — скорость роста популяции в отсутствие ограничений. Динамика численности в этом случае представлена на рис. 126 кривыми 2. При любом исходном состоянии популяции ее численность монотонно стремится к значению  $K$ . Таким образом,  $K$  представляет собой максимально возможную численность популяции. Если исходная численность меньше  $K/2$ , то кривая зависимости численности от времени имеет на высоте  $K/2$  перегиб.

Рассмотрим свойства стационарных состояний уравнения (VIII. 2.3), пользуясь методами качественной теории дифференциальных уравнений. В стационарном состоянии  $\bar{x}$   $dx/dt = 0$ ; в описываемом случае уравнение стационарных состояний  $(r\bar{x}(1 - \bar{x}/K) = 0$  имеет два корня:  $\bar{x}_1 = 0$ ,  $\bar{x}_2 = K$ . Для исследования устойчивости решений воспользуемся аналитическим методом Ляпунова. Введем новую переменную  $\xi$ , обозначающую отклонение переменной  $x$  от ее стационарного значения:  $\xi = x - \bar{x}$ . Запишем линеаризованное уравнение для нелинейного уравнения (VIII.2.3):  $d\xi/dt = a\xi$ , где  $a = f'(x)|_{x=\bar{x}}$ .

Знак величины  $a(\bar{x}_i)$  определяет устойчивость соответствующей особой точки  $\bar{x}_i$  ( $i = 1, 2$ ):

$$f'(x)|_{x=\bar{x}} = r - (2r\bar{x}/K). \quad (\text{VIII.2.4})$$



Подставив в выражение (VIII.2.4) значение первого корня  $\bar{x}_1 = 0$ , получим  $a(\bar{x}_1) = r$ . Эта величина всегда положительна, так как, по определению,  $r$  — коэффициент естественной скорости роста популяции ( $r$  — величина положительная). Следовательно,  $\bar{x}_1 = 0$  — неустойчивая особая точка. Если подставить в выражение (VIII.2.4)  $\bar{x}_2 = K$ , то  $a(\bar{x}_2) = -r$ , т. е.  $r$  становится отрицательной величиной; следовательно, стационарное решение уравнения (VIII.2.3)  $\bar{x}_2 = K$  является устойчивым и соответствует устойчивому стационарному режиму существования популяции в ограниченной среде.

Проведем теперь исследование устойчивости стационарных решений уравнения (VIII.2.3), исходя из графика функции  $f(x) = dx/dt$ . Из рис. 126, А (кривая 2) видно, что при переходе от отрицательных к положительным значениям  $x$  в точке  $\bar{x}_1 = 0$  функция  $f(x)$  меняет знак с минуса на плюс, т. е. особая точка является неустойчивой. Наоборот, в точке  $\bar{x}_2 = K$  знак  $f(x)$  с ростом  $x$  меняется с плюса на минус; следовательно, эта особая точка — устойчивая.

Таким образом, качественное исследование дифференциального уравнения (VIII.2.3) для численности популяции в ограниченной среде показывает монотонное стремление численности к определенной максимальной величине  $K$ . Уравнение (VIII.2.3) хорошо описывает некоторые реальные процессы, например процесс размножения пенициллиновых грибов в культуральной среде.

Если же численность популяции ведет себя по-иному, например колеблется или меняется хаотически, необходимо обратиться к другому математическому аппарату для описания процесса. Одна из возможностей — учет взаимодействия изучаемой популяции с другими — требует введения в модель новых переменных и соответственно дополнительных уравнений. Другая — переход к разностным уравнениям — разобрана ниже.

### **Разностное уравнение для численности популяции в ограниченной среде**

Описание динамики численности при помощи уравнения типа (VIII.2.1); (VIII.2.2); (VIII.2.3) предполагает некоторые допущения. Для того чтобы численность популяции можно было аппроксимировать непрерывной кривой, она должна быть достаточно многочисленной. Запись закона изменения переменной в виде обыкновенных дифференциальных уравнений предполагает, что изменение численности в каждый момент времени  $t$  зависит лишь от мгновенного ее значения в данный момент времени.

Более соответствует реальному представлению о численности как о дискретной величине  $N_t$ , которая принимает некоторые значения в фиксированные моменты времени. Это в точности отражает процесс

переписи реальных (лабораторных или естественных) популяций. Если при этом также учесть, что численность  $N_t$  зависит от численности в предшествующие моменты времени, возникает необходимость использовать аппарат разностных уравнений. Особенно просто записывать разностные уравнения, если численность каждого следующего поколения  $N_{t+1}$  зависит только от численности предыдущего поколения  $N_t$ . Это справедливо для популяций с неперекрывающимися поколениями, например многих видов насекомых. При таком рассмотрении уравнение (VIII.2.1) превращается в уравнение

$$N_{t+1} = F(N_t), \quad (\text{VIII.2.5})$$

или

$$N_{t+1} = N_t f(N_t).$$

Рассмотрим разностный аналог рассмотренного логистического уравнения (VIII.2.3), для чего запишем его в виде

$$dN/dt = rN(1 - N/K).$$

Здесь  $r$  — коэффициент естественной скорости роста популяции,  $K$  — максимально возможная ее численность, допускаемая емкостью среды. Заменяем  $dN/dt$  на  $\Delta N/\Delta t$ , где  $\Delta N = N_{t+1} - N_t$  — разность численностей в последовательные моменты времени,  $\Delta t = 1$ . Тогда

$$N_{t+1} = N_t [1 + r(1 - N_t/K)]. \quad (\text{VIII.2.6})$$

Однако если в какой-то момент времени значение численности становится больше определенной величины:  $N_t > K(1+r)/r$ , то уравнение (VIII.2.6) дает отрицательное значение  $N_{t+1}$ . Это связано с видом функции  $f(N_t) = 1 + r(1 - N_t/K)$ , изображенной на рис. 127. Таким образом, уравнение (VIII.2.6) биологически не корректно. Непрерывный аналог логистического уравнения свободен от этого недостатка, так как в нем при стремлении функции  $f(N) = r(1 - N/K)$  к нулю стремится к нулю и скорость возрастания  $N: dN/dt$ .

Для того чтобы исправить недостаток уравнения (VIII.2.6), следует взять в качестве  $f(N_t)$  функцию, асимптотически стремящуюся к нулю при  $N_t \rightarrow \infty$ . В частности, может быть выбрана функция  $\exp[r(1 - N_t/K)]$  (рис. 127, Б). Уравнение

$$N_{t+1} = N_t \exp[r(1 - N_t/K)] \quad (\text{VIII.2.7})$$

может быть рассмотрено в виде разностного аналога логистического уравнения.

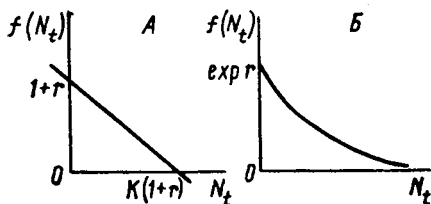


Рис. 127. Вид функции  $f(N_t)$ . А —  $[1 + r(1 - (N_t/K))]$ ; Б —  $\exp\{r(1 - N_t/K)\}$

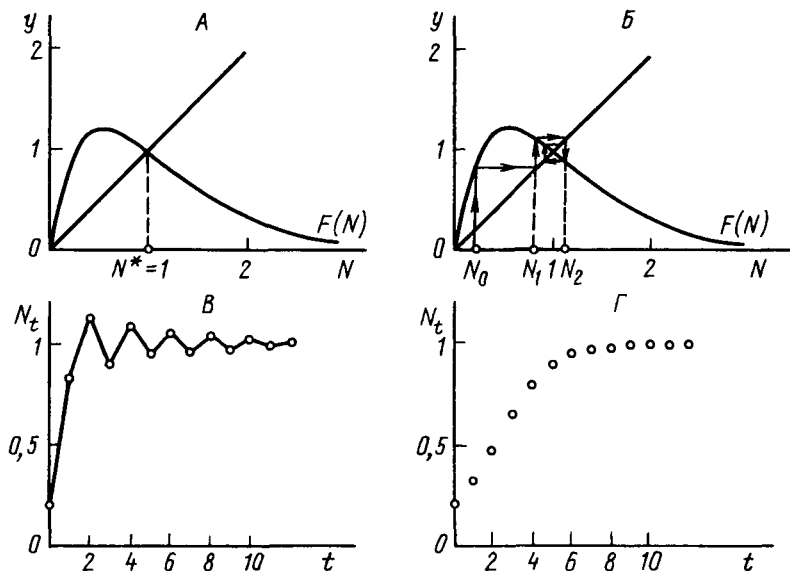


Рис. 128. Определение равновесного состояния в дискретной модели популяции [уравнение (VIII.2.7)] (остальные объяснения см. в тексте)

Ход решения наглядно демонстрируется графически при помощи так называемой диаграммы и лестницы Ламарея (рис. 128). Если изобразить на одном графике зависимость правой и левой частей уравнения (VIII. 2.7) от  $N$ , то воспроизводится картина, приведенная на рис. 128, А: прямая  $N = y$  — биссектриса координатного угла,  $F(N) = N \exp [r(1 - N/K)]$  — функция, имеющая максимум. Точка их пересечения представляет собой равновесное состояние системы, аналогичное стационарному состоянию дифференциального уравнения.

На рис. 128, Б проиллюстрирован способ нахождения значений в последовательные моменты времени (лестница Ламарея). Пусть в начальный момент времени  $N = N_0$ . Значение  $F(N_0)$  задает величину  $N_1$  в последующий момент времени:  $t = 1$ .  $N_1$ , в свою очередь, определяет  $F(N_1)$  и, следовательно,  $N_2$  и т. д. На рис. 128, В изображен случай, когда траектория сходится к равновесному состоянию, совершая затухающие колебания; однако возможно и монотонное стремление численности  $N_t$  к равновесному состоянию (рис. 128, Г).

К разностному уравнению применимы понятия, употребляемые при работе с дифференциальными уравнениями. *Решением*, или *траекторией*, уравнения (VIII. 2.5) является любая последовательность значений  $\{N_t\}$  ( $t = 0, 1, \dots$ ), удовлетворяющая данному разностному соотношению при каждом  $t$ . Различным начальным значениям  $N_0$  соответствуют разные решения. Устойчивость решений можно определить так же, как устойчивость по Ляпунову решений дифференциальных уравнений: при достаточно малых отклонениях начального значения новое решение мало отличается от исходного.

*Равновесием* называется решение вида  $N_t = \text{const} = N^*$ , удовлетворяющее соотношению

$$N^* = F(N^*). \quad (\text{VIII.2.8})$$

Если решение (VIII.2.8) устойчиво, его называют *устойчивой точкой*. В общем случае равновесие возможно, если уравнение (VIII.2.8) имеет хотя бы один положительный корень  $N^*$ .

Как и в случае дифференциального уравнения, для исследования устойчивости равновесия применим линейный анализ. Положим  $N_t = N^* + x_t$ , линеаризуем уравнение (VIII.2.5), разлагая  $F$  в ряд по степеням  $N_t - N^* = x_t$  и отбрасывая члены порядка  $x_t^2$  и выше:

$$x_{t+1} = (dF/dN)_{N^*} x_t + 0(x_t^2).$$

Из условий сходимости геометрической прогрессии следует что  $x_t \rightarrow 0$  при  $t \rightarrow \infty$ , если  $|dF/dN|_{N^*} < 1$ , и  $x_t \rightarrow \infty$  при  $t \rightarrow \infty$ , если  $|dF/dN|_{N^*} > 1$ . Эти условия и определяют устойчивость равновесия  $N^*$  системы. Случаи  $|dF/dN| = 1$  и  $dF/dN = 0$  требуют дополнительного исследования членов более высокого порядка в разложении.

Можно сделать некоторые заключения о характере приближения (или удаления) решений от равновесия: в случае устойчивого равновесия при

$$0 < (dF/dN)_{N^*} < 1 \quad (\text{VIII.2.9})$$

отклонения от равновесия исчезают монотонно.  
Если

$$-1 < (dF/dN)_{N^*} < 0, \quad (\text{VIII.2.10})$$

то имеют место затухающие колебания вокруг  $N^*$ . Если равновесие неустойчивое, то при

$$(dF/dN)_{N^*} > 1 \quad (\text{VIII.2.11})$$

отклонение от равновесия монотонно растет, а при

$$(dF/dN)_{N^*} < -1 \quad (\text{VIII.2.12})$$

удаление от равновесия происходит в виде нарастающих колебаний.

Для изучаемого уравнения (VIII. 2.7) равновесие находят из выражения

$$\exp [r(1 - N^*/K)] = 1.$$

Очевидно, что единственное равновесное значение  $N^* = K > 0$  существует при любом  $r$ . Условия (VIII.2.9), (VIII.2.10) показывают, что устойчивая точка имеет место, если  $0 < r < 2$ , при этом  $N_t \rightarrow N^*$  монотонно при  $0 < r < 1$  и колебательным образом при  $1 < r < 2$ .

Если  $r < 0$  или  $r > 2$ , из условий (VIII.2.11), (VIII.2.12) следует, что равновесие неустойчиво.

Разностные уравнения могут иметь и более сложные решения, например в них возможны *циклы*, являющиеся аналогами предельных циклов для систем дифференциальных уравнений. Циклом длины  $T$  называется решение  $\{N_t^*\}$  уравнения (VIII.2.5), состоящее из конечного набора  $T$  значений, повторяющихся в строгой последовательности (т. е.  $N_t^* = N_{t+T}^*$ ,  $t = 0, 1, 2, \dots$ ;  $N_{t+j}^* \neq N_t^*$ ,  $j = 1, 2, \dots, T - 1$ ).

Уравнение (VIII.2.7) демонстрирует двухточечные циклы при  $2 < r < 2,526$ , а при дальнейшем возрастании значений параметра  $r$  встречаются устойчивые циклы периода 4, 8, 16, ...,  $2^k$ . Циклическое поведение численности  $N_t$  показано на рис. 129.

Равновесие и устойчивые периодические колебания отражают часто наблюдаемые в природе типы регулярного поведения биологических систем. В то же время хорошо известны примеры биологических систем с нерегулярным поведением. Существуют виды насекомых, у которых в течение длительного срока наблюдаются слабые изменения численности, сменяющиеся внезапно вспышками. При этом максимальная численность превышает минимальную в десятки тысяч раз. Вспышки размножения происходят с неравными интервалами времени. Такое поведение называется хаотическим и характеризуется крайней степенью неустойчивости движения. Состояние системы с хаотическим поведением не поддается прогнозу. Как бы ни задавались начальные данные, судьба биологиче-

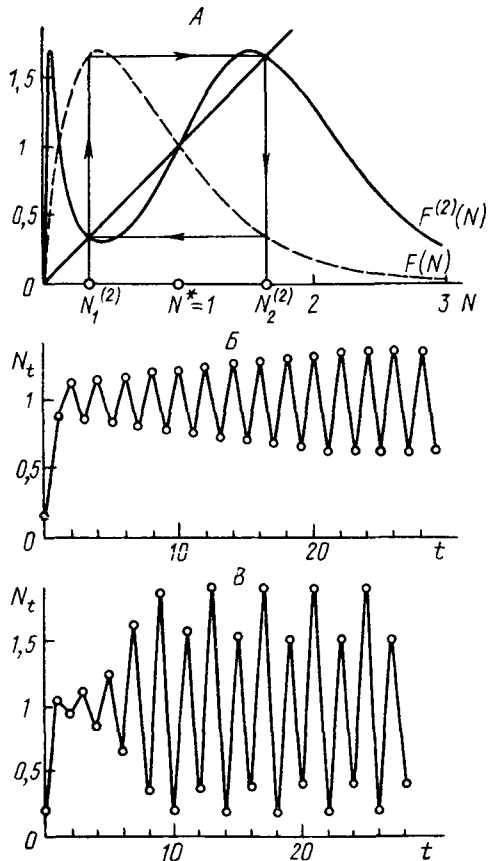


Рис. 129. Циклическое поведение решений уравнения (VIII.2.7):

$A$  — диаграмма Ламерея для двухточечного цикла ( $r=2,4$ );  $B$  — двухточечный цикл ( $r=2,1$ ;  $N_0=0,16$ );  $B$  — четырехточечный цикл ( $r=2,6$ ;  $N_0=0,1$ )

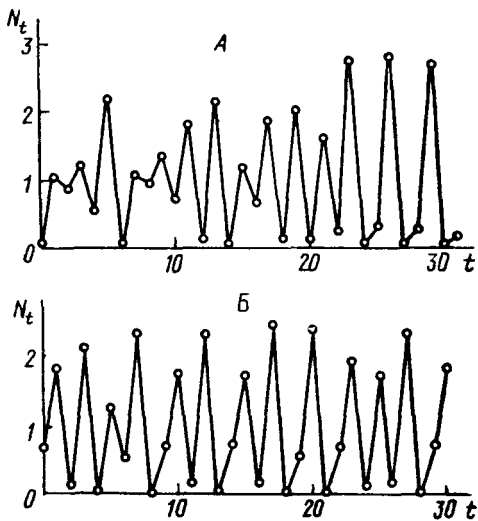


Рис. 130. Примеры хаотических режимов для уравнения (VIII.2.7) ( $r=3,2$ ;  $K=1$ ):

А —  $N_0 = 0,05$ ; нарастающие колебания возле неустойчивого равновесия  $N^* = 1$  попадают начиная с  $t = 23$  в окрестность трехточечного цикла. Цикл неустойчив, и в дальнейшем характер решений меняется; Б —  $N_0 = 0,7$ ; хаотическая траектория без видимых закономерностей

имеет решения любого периода и существует несчетное множество начальных значений  $N_0$ , при которых решение не стремится ни к одному из этих циклов, т. е. хаотично. Поведение решения разностного уравнения (VIII.2.7) в этом случае принципиально зависит от начального значения  $N_0$ . Графический анализ показывает, что при  $r > r_{кр} = 3,102$  существует два различных трехточечных цикла, а при  $r < r_{кр}$  трехточечных циклов нет. Следовательно, решения находятся в хаотическом режиме, когда  $r > r_{кр}$  (рис. 130).

Таким образом, задавая различные значения параметра естественной скорости роста  $r$  и начальной численности популяции  $N_0$ , на ЭВМ можно получить качественно различные типы поведения переменной  $N_t$ , удовлетворяющие разностному уравнению (VIII.2.7). Богатый спектр поведения траекторий содержит устойчивое равновесие, устойчивые циклы любой длины и хаотический режим, тип которого зависит от начальных условий (рис. 132, А, Б).

Решение разностных уравнений лежит в основе моделирования любых реальных биологических процессов, в особенности экологических.

Богатство динамического поведения модельных траекторий разностных уравнений является основой их успешного применения для описания сложных природных явлений. При этом ограничен-

ской популяции через конечный промежуток времени практически непредсказуема.

Несмотря на кажущуюся сложность хаотической динамики, она может быть продемонстрирована на сравнительно простых разностных моделях. В частности, разностное уравнение (VIII.2.7) наряду с равновесием и циклами может иметь хаотические решения, не стремящиеся ни к какому притягивающему решению. При этом существует связь между наличием трехточечных циклов и существованием хаотических режимов. Можно показать, что если уравнение обладает трехточечным циклом, то оно также

ность параметрических областей существования определенного типа решений может служить дополнительным основанием для оценки адекватности предлагаемой модели.

### Примерное построение учебной задачи

1. Написать программу для ЭВМ для решения (VIII.2.7) и получить на ЭВМ численность  $N_i$  в зависимости от времени при различных значениях  $N_0$  и  $r$ , соответствующих трем различным типам динамического поведения модели: устойчивому равновесию, устойчивым циклам и хаотическому поведению системы.

2. Написать программу для ЭВМ решения непрерывного уравнения (VIII.2.3), получить динамику численности  $x(t)$  на этой модели при тех же значениях параметров и сравнить решения, полученные для дифференциального (VIII.2.3) и разностного (VIII.2.7) уравнений. Результаты представить в виде графиков. Для решения может быть использован численный метод Рунге — Кутты.

### § 3. Модель переноса электрона в фотосинтетической электрон-транспортной цепи. Выяснение типа взаимодействия переносчиков

Процессы трансформации энергии при фотосинтезе включают в себя в качестве необходимого элемента перенос электронов между встроенными в мембрану окислительно-восстановительными ферментами, образующими электрон-транспортную цепь (ЭТЦ). В результате переноса электрона по ЭТЦ и дальнейших превращений энергия света запасается в виде энергии макроорганических связей АТФ.

Модель фотосинтетической ЭТЦ в терминах современной теории управления может быть записана в следующем виде:

$$dx/dt := F(x, u); \quad x(t = t_0) = x_0;$$

$$y = \eta(x) + v(t),$$

где  $x$  —  $N_x$ -мерный вектор, характеризующий состояние переносчиков электронов в ЭТЦ;  $t$  — время;  $v$ ,  $u$  —  $N_v$ -мерный и  $N_u$ -мерный векторы управления (входа) и наблюдения (выхода). Компоненты вектора наблюдений  $u$  являются функциями переменных системы  $x$  и могут также испытывать влияние шумов измерений  $v$ , искажающих результаты наблюдения за системой;  $\eta(x) = Hx$ ,  $H$  — матрица коэффициентов размерности  $N_u \times N_x$ ;  $v(t)$  —  $N_v$ -мерный вектор шумов измерений;  $F$  — оператор переходов.

При построении модели оператора  $F$  исходят из имеющихся представлений о механизмах переноса электронов между компонентами ЭТЦ. Процесс представляет собой последовательность окислительно-восстановительных реакций между локализованными в фотосинтетической мембране молекулами, организованными в комплексы, и может быть описан системой линейных дифференциальных уравнений для вероятностей состояний этих комплексов. Возможно так-

же бимолекулярное взаимодействие компонентов фотосинтетических комплексов с подвижными в мембране или среде окислительно-восстановительными агентами; этот процесс может быть описан с помощью закона действующих масс. Например, подвижные в фотосинтетической мембране переносчики — пластохиноны — осуществляют сопряженный с переносом протонов перенос электронов между второй и первой фотосистемами зеленых растений.

При построении математической модели ЭТЦ конкретного фотосинтезирующего объекта необходимо знать тип взаимодействия переносчиков на том или ином участке цепи. В математической формулировке вопрос сводится к выяснению формы оператора  $F$ , характеризующего связь между переменными системы и управляющими воздействиями. Решить вопрос о природе взаимодействия переносчиков помогает сравнение свойств альтернативных моделей (в соответствии со схемой VIII.1.2). На первом этапе исследования можно считать, что наблюдаемые отклики системы на управляющие воздействия (в данном случае включение и выключение света) не искажены шумами.

Рассмотрим два типа описания переноса электрона: при помощи закона действующих масс, пригодное для окислительно-восстановительных реакций в растворе, вероятностное — для переноса электрона в мультиферментном комплексе.

Применение закона действующих масс основано на предположении о том, что вероятность протекания реакции (в разбираемом случае — окислительно-восстановительной) определяется вероятностями нахождения каждого из реагентов в реакционноспособном состоянии.

Например, для реакции переноса электрона между двумя подвижными переносчиками  $C_1$  и  $C_2$ , взаимодействующими по схеме



кинетические уравнения могут быть записаны в виде

$$d[C_1]/dt = k_1[D^1][C_1^0] - k_2'[C_1][C_2^0];$$

$$d[C_2]/dt = k_2'[C_1][C_2^0] - k_3'[C_2][A^0].$$

Здесь  $[D^1]$ ,  $[C_1^1]$ ,  $[C_2^1]$  — концентрации восстановленной формы экзогенного донора  $D$  и переносчиков электронов  $C_1$  и  $C_2$ ;  $[C_1^0]$ ,  $[C_2^0]$ ,  $[A^0]$  — концентрации окисленной формы переносчиков  $C_1$  и  $C_2$  и экзогенного акцептора  $A$ ;  $k_1'$ ,  $k_2'$ ,  $k_3'$  — бимолекулярные константы скорости соответствующих реакций.

В дальнейшем будем считать, что концентрация соответствующих форм экзогенных доноров и акцепторов поддерживается постоянной на всем рассматриваемом промежутке времени и что общие концентрации переносчиков  $[C_{10}]$  и  $[C_{20}]$  равны. Предположим, что каждый переносчик может находиться только в одном из двух со-



стояний: окисленном (верхний индекс — 0) или восстановленном (верхний индекс — 1):

$$[C_1^1] + [C_1^0] = [C_{10}]; [C_2^1] + [C_2^0] = [C_{20}], [C_{10}] = [C_{20}].$$

Эти предположения позволяют записать систему дифференциальных уравнений для относительных концентраций соответствующих переносчиков в восстановленной форме:

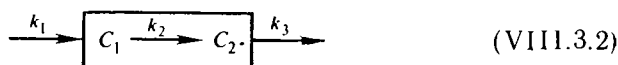
$$\begin{aligned} dy_1/dt &= k_1(1-y_1) - k_2 y_1(1-y_2), \\ dy_2/dt &= k_2 y_1(1-y_2) - k_3 y_2. \end{aligned} \quad (\text{VIII.3.1a})$$

Здесь  $y_1 = [C_1^1]/[C_{10}]$ ;  $y_2 = [C_2^1]/[C_{20}]$ ;  
 $k_1 = k_1' [D^1]$ ;  $k_2 = k_2' [C_{20}]$ ;  $k_3 = k_3' [A^0]$ .

Система уравнений для цепи из  $n$  компонентов содержит  $n$  нелинейных уравнений. Для случая  $n = 1, 2, 3$  стационарное решение можно найти аналитически. Для нахождения стационарного решения при  $n > 3$  и определения поведения переменных во времени при  $n \geq 2$  требуется ЭВМ.

2. Фотосинтетический реакционный центр (РЦ) представляет собой молекулярную машину, которая «включается» квантом света. РЦ представляет собой фиксированный в мембране мультиферментный комплекс, редокс-состояния компонентов которого не являются независимыми друг от друга.

Рассмотрим принципы математического описания переноса электрона в *комплексах молекул-переносчиков*, внутри которых задана строгая последовательность взаимодействия переносчиков электрона друг с другом. Пусть существует пара переносчиков  $C_1$  и  $C_2$ , объединенных в комплекс:



Перенос электрона от  $C_1$  к  $C_2$  в рассматриваемом случае является мономолекулярным процессом, поскольку в едином акте протекают как окисление  $C_1$ , так и восстановление  $C_2$ . В силу этого перенос электрона между  $C_1$  и  $C_2$  не происходит, когда оба переносчика, входящие в комплекс, одновременно или окислены, или восстановлены. Поэтому для описания переноса электрона в таких комплексах следует рассматривать состояния сразу двух переносчиков, участвующих в переносе электрона. Скорость переноса электрона между  $C_1$  и  $C_2$  в рассматриваемом случае пропорциональна концентрации комплексов, находящихся в состоянии  $[C_1^1 C_2^0]$ , когда переносчик  $C_1$  восстановлен, а переносчик  $C_2$  окислен. Тогда скорость переноса электронов между  $C_1$  и  $C_2$  равна  $v = k_2 [C_1^1 C_2^0]$ .

В общем случае для описания переноса электронов в комплексе необходимо рассматривать все состояния, в которых может нахо-

даться комплекс. При этом каждый из переносчиков, входящих в комплекс, может находиться в окисленной или восстановленной форме, в протонированном или депротонированном состоянии и пр.

Обозначим состояния комплекса через  $S_1, S_2, \dots, S_n$  и введем вероятность того, что комплекс переносчиков находится в состоянии  $S_i$  в момент времени  $t$ :  $p_i(S_i, t) = p_i(t)$ . События  $S_1, S_2, \dots, S_n$  несовместны и образуют полную группу событий, поэтому выполняется равенство (условие нормировки)

$$\sum_j p(S_j, t) = 1.$$

Будем рассматривать переходы между состояниями  $S_i$  комплекса как марковский процесс с конечным числом состояний и непрерывным временем. В этом случае переходы комплекса из одного состояния в другое описываются системой линейных дифференциальных уравнений относительно вероятностей

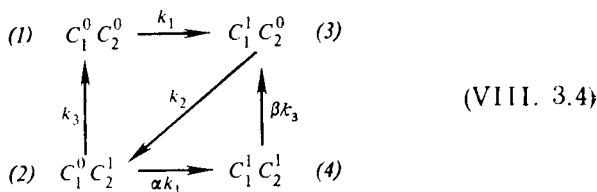
$$\begin{aligned} dp_i/dt &= \sum_{j=1}^n (p_j k_{ji} - p_i k_{ij}); \\ p_j(0) &= b_j \quad (i = 1, \dots, n), \end{aligned} \quad (\text{VIII.3.3})$$

или в векторном виде  $dp/dt = K^T p$ ;  $p(0) = b$ . Здесь вектор  $p = (p_1(t), \dots, p_n(t))$ ;  $p_i(t)$  — вероятность того, что комплекс переносчиков находится в  $i$ -м состоянии в момент  $t$ ,  $K^T$  — матрица, транспонированная к матрице  $K = (k_{ij})$ , элементы которой  $k_{ij}$  ( $i \neq j$ ) суть константы скоростей перехода из  $i$ -го состояния комплекса в  $j$ -е, причем  $k_{ii} = -\sum_j k_{ij}$ ;  $b = (b_1, \dots, b_n)$  — вектор вероятностей начальных состояний комплекса.

Общий вид решения системы (VIII.3.3) может быть записан в виде

$$p = \exp(K^T t) b.$$

При рассмотрении конкретных ЭТЦ удобно представлять состояния комплекса в виде размеченного графа, в вершинах которого стоят состояния комплекса, а стрелки указывают возможные переходы между состояниями. В частности, для переноса электрона в комплексе из двух переносчиков (VIII.3.2) размеченный граф состояний будет иметь следующий вид:



Здесь верхние индексы 0 и 1 означают отсутствие и наличие электрона на соответствующем переносчике; цифры в скобках указывают номер состояния комплекса;  $k_i$  — константы скоростей соответствующих переходов. В общем случае константы скоростей переходов между состояниями комплекса могут зависеть от состояний переносчиков, не принимающих непосредственно участия в реакции (*эффект кооперативности*). Параметры  $\alpha$  и  $\beta$  характеризуют степень кооперативности. Например, скорость притока электронов от внешнего донора на переносчик  $C_1$  может быть различной в зависимости от окислительно-восстановительного состояния переносчика  $C_2$  ( $\alpha \neq 1$ ).

Система дифференциальных уравнений для вероятностей состояний комплекса  $C_1C_2$ , описывающая его функционирование, согласно (VIII.3.4) при  $\alpha = \beta = 1$  имеет вид

$$\begin{aligned} dp_1/dt &= k_3 p_2 - k_1 p_1; & dp_2/dt &= k_2 p_3 - (k_1 + k_3) p_2; \\ dp_3/dt &= k_1 p_1 + k_3 p_4 - k_2 p_3; & dp/dt &= k_1 p_2 - k_3 p_4; \\ \sum_{i=1}^4 p_i &= 1; & p_i(0) &= b_i. \end{aligned}$$

Решив систему уравнений (VIII.3.5) относительно вероятностей состояний комплекса  $p_i$ , легко найти и вероятности состояний отдельных переносчиков, просуммировав вероятности всех тех состояний комплекса, которые содержат рассматриваемый переносчик в интересующем нас состоянии. Например, вероятность того, что первый переносчик находится в окисленном состоянии, равна сумме вероятностей первого и второго состояний [см. (VIII.3.4)]:

$$p(C_1^0) = p(C_1^0 C_2^0) + p(C_1^0 C_2^1) = p_1 + p_2 = 1 - p(C_1^1).$$

В общем виде

$$p(C_i^0, t) = \sum_{S_q \in C_i^0} p(S_q, t); \quad p(C_i^1, t) = 1 - p(C_i^0, t),$$

$$\text{или } p(B) = \sum_{S_q \in B} p(S_q, t),$$

где суммирование производится по всем тем элементарным событиям  $S_q$ , которые составляют событие  $B$ .

Для большого числа одинаковых, не взаимодействующих между собой комплексов переносчиков введенные выше вероятности  $p(S_i, t)$  и  $p(C_i^0, t)$ , согласно закону больших чисел, приближенно равны соответственно доле комплексов, находящихся в состоянии  $S_i$ , и доле молекул-переносчиков  $C_i$ , которые находятся в соответствующем состоянии.

**Сравнение двух типов описаний.** Несмотря на то что вероятностное описание переноса электрона в комплексах и описание окислительно-восстановительных реакций в растворе при помощи закона



Основные отличия характеристик при двух способах описания заключаются в следующем.

1. «В растворе» после включения света кинетика окисления компонентов  $P$  и  $C$  при малых значениях константы входа  $k_{вх}$  монотонна независимо от значения световой константы  $k_0$ . Концентрация акцептора  $A$  в процессе восстановления в модели проходит через максимум независимо от способа описания. При больших значениях  $k_{вх}$  ( $k_{вх} > k_{вых}$ ) окисление  $C$  и  $P$  немонотонно. «В комплексе» при больших  $k_0$  окисление компонентов  $C$  и  $P$  может носить немонотонный характер и при небольших  $k_{вх}$  ( $k_{вх} < k_{вых}$ ).

2. Световые кривые (зависимости стационарной окисленности от значения световой константы  $k_0$ ) компонента  $P$  в «растворе» носят S-образный характер в том случае, когда константа скорости притока электронов в систему ( $k_{вх}$ ) меньше константы скорости оттока электронов из системы ( $k_{вых}$ ). В «комплексе» S-образность световой кривой компонента  $P$  не наблюдается.

3. «В растворе» при наличии циклического потока ( $k_c \neq 0$ ) время восстановления компонента  $C$  ( $\tau_C^{восст}$ ) после выключения света убывает с ростом его первоначальной окисленности  $\bar{C}^0$ , стационарной для светового процесса и определяемой интенсивностью предшествующего освещения. «В комплексе»  $\tau_C^{восст}$  в большей или меньшей степени возрастает с увеличением  $\bar{C}^0$  при любых значениях параметров цепи.

Совокупность этих зависимостей в сравнении с экспериментальными данными может служить критерием справедливости той или иной модели взаимодействия переносчиков на изучаемом участке цепи. Например, при решении вопроса о том, каким образом замыкается циклический поток электронов, «в комплексе» или через подвижные переносчики, наиболее удобным критерием является рассмотрение экспериментальной зависимости  $\tau_C^{восст}(\bar{C}^0)$ , которая обнаруживает «в комплексе» и «в растворе» противоположный характер.

### Примерное построение учебной задачи

1. Построить размеченный граф состояний для комплекса из трех переносчиков [см. (VIII.3.6)].

2. Записать систему дифференциальных уравнений для вероятностей состояний комплекса.

3. Написать программу для решения системы уравнений на ЭВМ.

4. Получить на модели кинетику переменных  $C$ ,  $P$  в окисленной и  $A$  в восстановленной форме при включении света ( $k_0 \neq 0$ ) и выключении света ( $k_0 = 0$ ) для разных значений интенсивности освещения (разных  $k_0$ ). Начальные условия для светового процесса:  $C$  и  $P$  полностью восстановлены,  $A$  полностью окислены. Возможны и другие варианты, соответствующие различным окислительно-восстановительным условиям в системе. Построить для модели [см. (VIII.3.6)] световые кривые и зависимости времени восстановления компонентов  $P$  и  $C$  от интенсивности и времени предшествующего освещения.

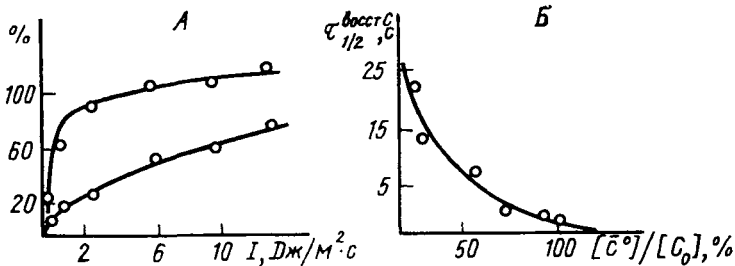


Рис. 132. Экспериментальные световые кривые (А) и кривая зависимости времени восстановления цитохрома от его первоначальной окисленности (Б)

5. Записать систему дифференциальных уравнений для окислительно-восстановительных реакций, протекающих согласно (VIII. 3.6) в том случае, если все компоненты находятся в растворе, т. е. в соответствии с законом действующих масс. Выполнить для этой системы задания пунктов 3.4. Сравнить полученные кинетические характеристики для двух типов описания. Результаты представить в виде графиков.

На рис. 132 представлены экспериментальные световые кривые (А) и кривые зависимости времени восстановления цитохрома  $c$  от его первоначальной окисленности (Б) для хроматофоров фотосинтезирующих бактерий *Chromatium minutissimum*. Задача может быть предложена при выполнении практики по математическому моделированию и ЭВМ.

Упрощенный вариант задачи предполагает выполнение тех же заданий для системы из двух переносчиков (VIII.3.1); (VII.3.1a); (VIII.3.2); (VIII.3.4); (VIII.3.5).

#### § 4. Идентификация математических моделей биологических процессов

*Идентификация* в широком смысле слова означает определение параметров и структуры математической модели, обеспечивающих наилучшее совпадение выходных координат модели и процесса при одинаковых входных воздействиях. Таким образом, идентификация состоит из трех этапов.

1. Выбор структуры модели на основании априорной информации об исследуемом процессе и качественных характеристик процесса и модели.

2. Выбор критерия близости объекта и модели, основанный на специфике задачи.

3. Определение параметров модели, оптимальных с точки зрения выбранного критерия близости (идентификация параметров модели).

В § 2,3 гл. VIII приведен пример *выбора структуры модели* по ее качественным свойствам. Следующим этапом работы является *выбор критерия близости объекта и модели*.

При проведении эксперимента на объект оказывают некоторое воздействие, например освещают его светом определенной интенсивности. Критерием близости объекта и модели естественно взять какую-либо функцию от рассогласования выходных сигналов объекта и модели при одинаковых входных воздействиях.

Обозначим выходные сигналы модели через  $y(t)$ , выходные сигналы объекта — через  $x(t)$ , а их рассогласование — через  $\varepsilon(t)$ :  $\varepsilon(t) = y(t) - x(t)$ . Пусть  $Q$  — *критерий близости модели и объекта*:  $Q = f(\varepsilon(t))$ .

Часто значение  $\varepsilon(t)$  в разные моменты времени имеет разную значимость для исследователя. Чтобы учесть это, введем *весовую функцию*  $\omega(t)$ . Тогда  $Q = f[\varepsilon(t), \omega(t)]$ .

Наиболее распространенным критерием близости модели и объекта является *критерий минимума среднеквадратичного отклонения*:  $Q(t) = \varepsilon^2(t) \omega(t)$ . Этот критерий привлекателен тем, что представляет собой выпуклую одноэкстремальную функцию относительно  $\varepsilon$ . Его применение приводит к наиболее удобному алгоритму поиска параметров модели.

«Выходные сигналы» модели зависят от значений ее параметров  $y = y(\theta_1, \dots, \theta_n)$  и  $t$ , поэтому  $Q$  является функцией параметров модели:

$$Q = Q(\theta_1, \theta_2, \dots, \theta_n, t).$$

Таким образом, идентификация параметров модели сводится к поиску минимума критерия  $Q$  в пространстве параметров  $\theta$ . При поиске минимума произвольной функции возникает проблема однозначности найденного набора значений параметров. Для обоснования единственности полученного решения осуществляют поиск минимума из различных начальных точек. Если процесс поиска заканчивается в одной и той же точке, найденный минимум можно считать единственным.

Задача минимизации функции ставит еще одну проблему — точности нахождения минимума. Эта проблема тесно связана с проблемой выбора стратегии поиска.

Рассмотрим простейший метод поиска минимума произвольной функции — *метод фитирования*, или *метод сетки*, который часто используют при идентификации параметров моделей биологических процессов. Для случая двух неизвестных параметров схема метода изображена на рис. 133. Здесь замкнутые линии — линии уровня исследуемой функции. В узлах «сетки» производят вычисление значений функции и из полученных значений выбирают наименьшее. Из рис. 133 видно, что найденный таким способом минимум может весьма далеко отстоять от истинного минимума. Для более точного определения необходимо сделать сетку более частой, а это сильно

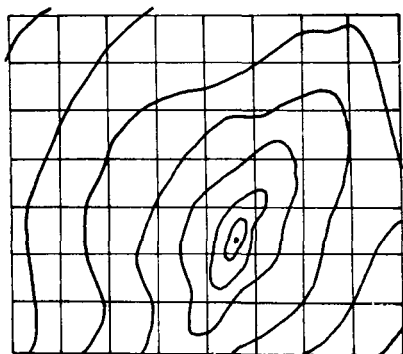


Рис. 133. Схема метода поиска экстремума методом сеток (фитирование)

увеличивает объем вычислений. Метод фитирования часто применяют для грубых оценок параметров, однако для более точных оценок необходимы более тонкие методы, позволяющие теми или иными способами отслеживать изменения функции.

Эти методы используют последовательную стратегию поиска — при выборе каждой следующей точки, где будет вычисляться функция, используется информация, полученная при предыдущих вычислениях, что позволяет существенно ускорить поиск и повысить точность нахождения минимума.

Как работают подобные методы, можно показать на примере одного из наиболее эффективных методов для поиска минимума нелинейных функций, особенно функций типа среднеквадратичного отклонения, — *метода конфигураций*. В основе метода лежит гипотеза о локальной неизменности направления поиска. На первом эта-

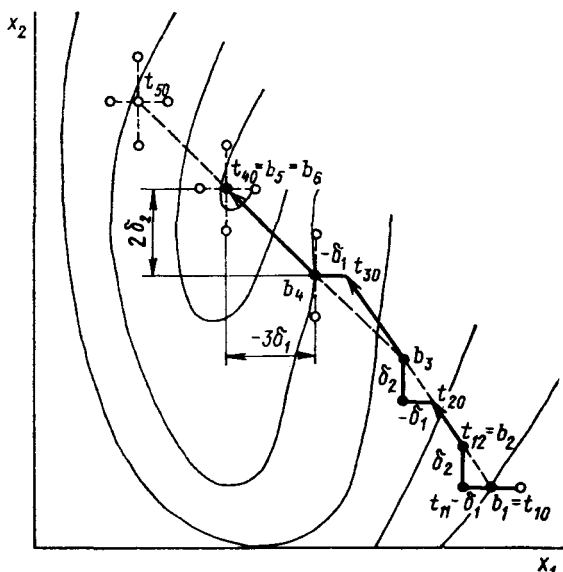


Рис. 134. Схема метода поиска экстремума целевой функции методом конфигураций (Хука и Дживса)



пе, в районе начальной точки, поиск ведется медленно, с помощью небольших шагов. По мере успешного продвижения вперед длина их возрастает, и это длится до тех пор, пока выбранное направление правильно. Затем поиск замедляется, вся процедура повторяется вновь и начинается движение в новом направлении. Поиск заканчивается, когда длина пробного шага станет меньше заранее заданной величины.

В процессе отработки метода удалось эмпирически установить, что время поиска растет пропорционально первой степени числа неизвестных параметров (в классических процедурах время растет пропорционально кубу числа переменных). Процесс поиска схематически изображен на рис. 134.

Поиск начинается в произвольной базовой точке  $\mathbf{b}_1 (x_{11}, x_{21}, \dots, x_{n1})$  и ведется шагами  $\delta_i$ , где  $\delta_i$  есть вектор длиной  $\delta_i$ , все составляющие которого, кроме  $i$ -й, равны нулю. Пусть сначала ведется поиск по первому неизвестному параметру  $\theta_1$ . Определяются значения функции в точках  $\mathbf{b}_1$  и  $(\mathbf{b}_1 + \delta_1)$ . Если точке  $(\mathbf{b}_1 + \delta_1)$  соответствует меньшее значение функции, то ее называют *временной вершиной*  $t_{11}$  и дальнейший поиск ведется уже из нее. Двойной индекс 11 означает, что ведется первый этап поиска и что изменению подвергался первый неизвестный параметр. Если точке  $(\mathbf{b}_1 + \delta_1)$  соответствует большее значение функции, то проверяют точку  $(\mathbf{b}_1 - \delta_1)$ . Возможно, что обе точки  $(\mathbf{b}_1 + \delta_1)$  и  $(\mathbf{b}_1 - \delta_1)$  окажутся непригодными. В этом случае временной вершиной служит сама точка  $\mathbf{b}_1$ , т. е.

$$t_{11} = \begin{cases} \mathbf{b}_1 + \delta_1, & \text{если } Q(\mathbf{b}_1 + \delta_1) < Q(\mathbf{b}_1); & \text{(VIII.4.1)} \\ \mathbf{b}_1 - \delta_1, & \text{если } Q(\mathbf{b}_1 - \delta_1) < Q(\mathbf{b}_1) < Q(\mathbf{b}_1 + \delta_1); & \text{(VIII.4.2)} \\ \mathbf{b}_1, & \text{если } Q(\mathbf{b}_1) < \min [Q(\mathbf{b}_1 + \delta_1), Q(\mathbf{b}_1 - \delta_1)]. & \text{(VIII.4.3)} \end{cases}$$

Рис. 134 соответствует неравенству (VIII.4.2).

Из вершины  $t_{11}$  аналогичным образом осуществляется поиск по следующему неизвестному параметру  $\theta_2$ . В общем случае для  $j$ -й временной вершины  $t_{1j}$ , найденной продвижением из  $t_{1, j-1}$ , можно записать:

$$t_{1j} = \begin{cases} t_{1, j-1} + \delta_j, & \text{если } Q(t_{1, j-1} + \delta_j) < Q(t_{1, j-1}); & \text{(VIII.4.4)} \\ t_{1, j-1} - \delta_j, & \text{если } Q(t_{1, j-1} - \delta_j) < Q(t_{1, j-1}) < Q(t_{1, j-1} + \delta_j); & \text{(VIII.4.5)} \\ t_{1, j-1}, & \text{если } Q(t_{1, j-1}) < \min [Q(t_{1, j-1} + \delta_j), Q(t_{1, j-1} - \delta_j)]. & \text{(VIII.4.6)} \end{cases}$$

На рис. 134 изображен случай, соответствующий неравенству (VIII.4.4) при  $j = 2$ .

В результате первого этапа поиска по всем переменным находится временная вершина  $t_{1n}$ , которой дают название второй базовой точки и обозначают  $\mathbf{b}_2$ . Базовые точки  $\mathbf{b}_1$  и  $\mathbf{b}_2$  определяют первую конфигурацию, представляющую собой стрелу, конец которой лежит в начальной точке поиска, а острие — в конечной.

Дальнейшая процедура поиска основывается на гипотезе о том, что направление движения из новой базовой точки остается тем же, что и на предыдущем участке. Опираясь на это предположение, отказываются от пробных движений вблизи точки  $\mathbf{b}_2$  и продвигаются в направлении  $\mathbf{b}_1\mathbf{b}_2$  сразу на двойную длину вектора  $\mathbf{b}_1\mathbf{b}_2$ . Это движение определяет новую временную вершину

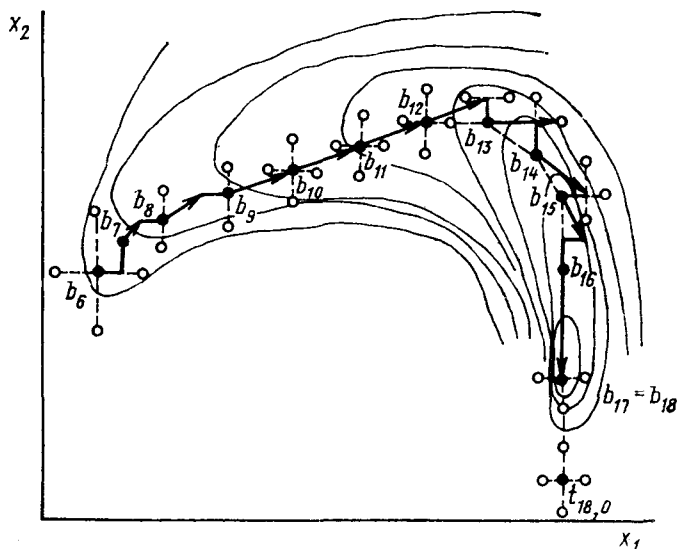


Рис. 135. Тактика «слежения за оврагом» целевой функции методом конфигураций

ну  $t_{20}$  второй конфигурации, начинающейся в точке  $b_2$ . Точка  $t_{20}$  определяется следующим образом:

$$t_{20} = b_1 + 2(b_2 - b_1) - 2b_2 - b_1.$$

Двойной индекс 20 означает, что осуществляется второй этап поиска и пробных движений не было. Далее вокруг точки  $t_{20}$  совершаются пробные шаги, цель которых — определить, не нуждается ли выбранное направление в коррекции. С помощью выражений, аналогичных (VIII.4.4)—(VIII.4.6), находят новые переменные вершины  $t_{21}$ ,  $t_{22}$ , ...,  $t_{2n}$ . Этот цикл пробных шагов по всем определяемым параметрам завершается нахождением вершины  $t_{2n}$ , которая и служит *третьей базовой точкой*  $b_3$  (рис. 134). Следующая временная вершина  $t_{30} = b_4$  определяется в результате движения вдоль линии  $b_2b_3$ :  $t_{30} = 2b_3 - b_2$ . На рис. 134 показано, что эта вершина лежит на одной прямой с точками  $b_2$  и  $b_1$ . Это означает, что в данном случае изменить направление поиска не понадобилось. Интересно отметить, что благодаря правильно выбранному направлению увеличилась и длина шага. Действительно,

$$b_3 - b_2 = 2(t_{20} - b_2) = 2(b_2 - b_1).$$

Аналогичным образом ведется поиск на третьей конфигурации. Предположим далее, что в результате пробных шагов по  $\theta_1$  и  $\theta_2$  временной вершиной оказалась точка  $t_{31}$ , которой соответствует меньшее, чем в  $b_3$ , значение функции  $Q$ . В этом случае  $b_4 = t_{32} = t_{31}$ , что приводит к изменению направления поиска. Как видно из рис. 134, длина шага все еще возрастает.

Пусть в результате пробных шагов на четвертой конфигурации было найдено, что  $t_{41}$  осталась временной вершиной, но  $Q(t_{40}) > Q(b_3)$ . В этом случае  $b_3 = t_{42} = t_{41} = t_{40}$ , так что направление дальнейшего движения и длина шага остаются неизменными.

Предположим, что дальнейшее продвижение из точки  $b_5$  приводит к тому, что конфигурация разрушается, т. е.  $Q(t_{50}) > Q(b_5)$  (рис. 135). В этом случае  $b_6 = b_5$ , а это означает, что либо найден минимум функции, либо поиск привел к «оврагу». Для выяснения ситуации приходится предпринимать следующие шаги.

Как и ранее, поиск начинается с пробных шагов около временной вершины  $b_6 = b_5$ . Может оказаться, что длина пробных шагов слишком велика, чтобы обнаружить овраг, тогда ее надо уменьшить. На рис. 135 изображена ситуация, когда уменьшение длины пробного шага вдвое позволило добиться положительного результата и продвинуться, хотя и ненамного, по направлению к минимуму функции. Последующие конфигурации до восьмой включительно характеризуются некоторым изменением направления поиска и увеличением шагов.

На 9-, 10- и 11-й конфигурациях направление оврага совпадает с направлением поиска, а величина шагов остается неизменной. В точке  $b_{12}$  начинается искривление оврага, в соответствии с этим меняется направление поиска, а длина шага сокращается. Это продолжается до точки  $b_{16}$ , где овраг вновь становится прямолинейным. Шестнадцатая конфигурация характеризуется резким ростом результирующего шага, но уже на 17-й процедуре поиска вновь обрывается.

На рис. 135 изображен случай, когда 19-ю конфигурацию можно найти путем дальнейшего сокращения длины пробных шагов. В ситуации, показанной на рис. 135, это не приводит к успеху и поиск считается законченным после того, как длина пробного шага станет меньше заранее заданной величины. В данном случае эта величина достигается после второго сокращения длины шага и  $b_{17}$  в самом деле является точкой минимума функции с точностью до разрешающей способности.

Из разобранных примеров видно, насколько точно метод конфигураций позволяет двигаться по «оврагу» до его «дна». Характеристики этого метода инвариантны относительно масштаба измерений, но, конечно, зависят от величины пробного шага и скорости, с которой уменьшается его длина при поиске оврага.

Описанный метод может быть применен для идентификации параметров широкого класса моделей биологических систем, представляющих собой системы дифференциальных уравнений, в частности нелинейных (см. Приложение).

## Глава IX

### Автоматизация биофизических исследований



#### § 1. Общие вопросы

Автоматизация эксперимента с применением средств вычислительной техники — одно из важнейших условий эффективности и качества труда научного работника. Возникновение проблемы автоматизации научных исследований в широком смысле является логическим развитием науки на современном этапе. Исследователю приходится вторгаться во все более сложные взаимосвязи в природе, изучение которых ставит задачи повышения чувствительности и точности анализа (находящихся за пределами собственных возможностей метода); обеспечения все более высокой скорости регистрации параметров изучаемых процессов; резкого увеличения комплексности анализа с расширением числа регулируемых, контролируемых и измеряемых параметров; расширения диапазона их измерений. Соответственно этому возрастает сложность обработки, адекватного отображения и интерпретации данных эксперимента.

Биологические методы как источник первичной информации и их аппаратная реализация постоянно совершенствуются. Однако принципиальным путем в решении вопросов дальнейшего развития уровня биофизических исследований является развитие и применение автоматизированных диалоговых систем на основе ЭВМ с привлечением современных математических методов «восстановления» экспериментального сигнала, расчета числовых параметров, характеризующих изучаемый объект, оперативного сравнения полученных данных с характеристиками математической модели.

На ЭВМ также могут быть возложены такие функции, как контроль параметров и управление установкой; непрерывный контроль

состояния и регулирование воздействий на изучаемый объект как по заранее заданной схеме, так и в зависимости от получаемых в ходе эксперимента результатов; проведение измерений; сбор, накопление и хранение данных; их обработка, обобщение и оперативное отображение; документирование полученных данных и их архивизация.

Таким образом, создание и применение систем автоматизации приводит не просто к дальнейшему совершенствованию биофизических методов, а является принципиально новым шагом в их развитии, обеспечивающим проведение экспериментов и получение информации, недоступной при постановке экспериментов на основе традиционных подходов.

Качественно новое следствие автоматизации научных исследований заключается в том, что включение в эксперимент ЭВМ дает возможность использовать в процессе исследования высокоэффективные методы численного анализа. Это, в свою очередь, позволяет изучать гораздо более сложные явления и, что наиболее важно, ставить такие эксперименты и развивать методы исследования, которые без ЭВМ принципиально невозможны.

Интенсивное развитие работ по внедрению ЭВМ в научные исследования в последние годы обусловлено не только необходимостью обеспечения качественно нового уровня экспериментальной работы, но и возможностями, открывающимися в связи с увеличением промышленного выпуска, снижением стоимости и габаритных размеров ЭВМ. Развитие вычислительной техники привело к значительному увеличению быстродействия, памяти, надежности ЭВМ. Электронные вычислительные машины стали более гибкими, приспособляемыми к различным задачам и «коммуникабельными» человеком. Разработаны перспективные методические основы создания систем ЭВМ — экспериментальное оборудование, основанные на унифицированных модульных структурах аппаратного и программного обеспечения, гарантирующих преемственность, развитие и интеграцию отдельных подсистем в крупные единые комплексы.

## **§ 2. Алгоритмические модели биофизического исследования**

Целью любого научного исследования является отнесение объекта исследования к известной модели, совершенствование ее или построение новых моделей, отражающих свойства реального объекта путем сопоставления данных теории и эксперимента.

В процессе исследования принимают участие исследователь, объект исследования и средства исследования (рис. 136). Все эти составляющие в процессе исследования находятся в состоянии взаимодействия и информационного обмена.

В наиболее общем виде процесс биофизического исследования можно представить в виде алгоритма, приведенного на рис. 137. Степень подробности алгоритма в процессе развития модели иссле-

дования увеличивается. Так, на рис. 138 и 139 приведены обобщенные алгоритмы теоретической и экспериментальной стадии исследования. Конечной целью развития алгоритма исследовательского процесса является уточнение и увеличение степени подробности совершаемых действий до описания неделимых элементарных операций.

Представление процесса исследования в виде алгоритма последовательных действий имеет принципиальное значение для решения вопроса о возможности его автоматизации. Рассмотрение алгоритмизированного процесса научного исследования позволяет выделить ряд этапов, связанных между собой, причем выходная информация одного этапа служит входной информацией другого. К особенностям исследования, с точки зрения автоматизации, следует отнести *цикличность* отдельных стадий процесса и его *разветвленность*. Ветвление алгоритма, как правило, проводится в блоках принятия решений (ромбы на рис. 137—139), относящихся к неформализуемым этапам, в проведении которых принимает активное участие исследователь. Выполнение этих этапов в значительной мере зависит от быстрого и удобного для восприятия представления данных.

Общей характерной особенностью научных исследований (к примеру, в отличие от технологических процессов) является *итерационный характер уточнения модели* в процессе все более глубокого

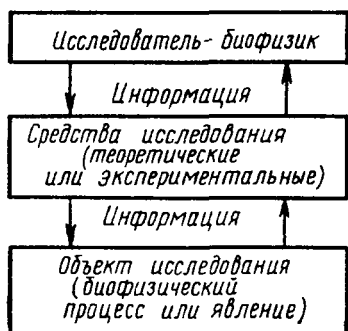


Рис. 136. Основные составляющие биофизического исследования

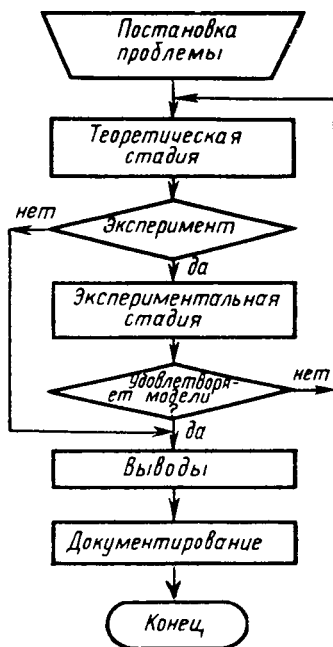


Рис. 137. Обобщенный алгоритм биофизического исследования

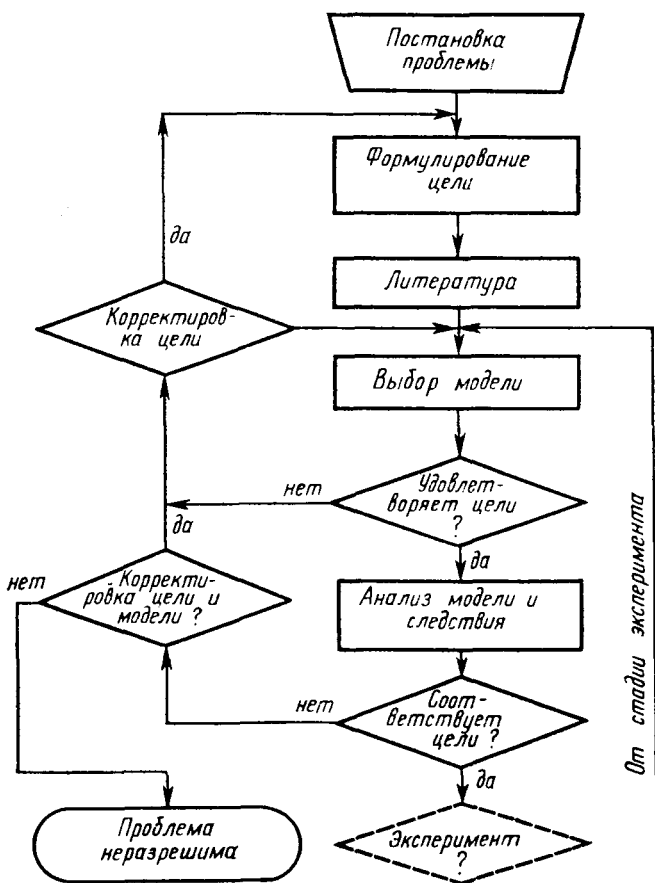


Рис. 138. Обобщенный алгоритм теоретической стадии биофизического исследования

проникновения в природу изучаемых объектов. Как правило, следствием такого подхода является последовательное усложнение модели и отдельных стадий исследования. На теоретической стадии это приводит к необходимости применения более сложных математических средств, что определяет широкое применение ЭВМ для автоматизации работ при теоретическом анализе. Аналогично этому, усложнение модели приводит к увеличению информационных потоков между исследователем и объектом исследования в процессе проведения эксперимента. Усложняются и этапы, связанные с оперативным отображением данных в виде, удобном для творческого восприятия и оценки получаемой информации. Все эти обстоятельст-

ва определяют принципиальную необходимость и непрерывно возрастающие потребности автоматизации научных исследований вообще и биофизических исследований в частности.

На современном этапе развития методических, математических, технических и программных средств научных исследований электронные вычислительные машины могут эффективно использоваться на всех этапах от поиска литературы и анализа литературных данных, формулирования цели и планирования исследования, до интерпретации и документирования данных.

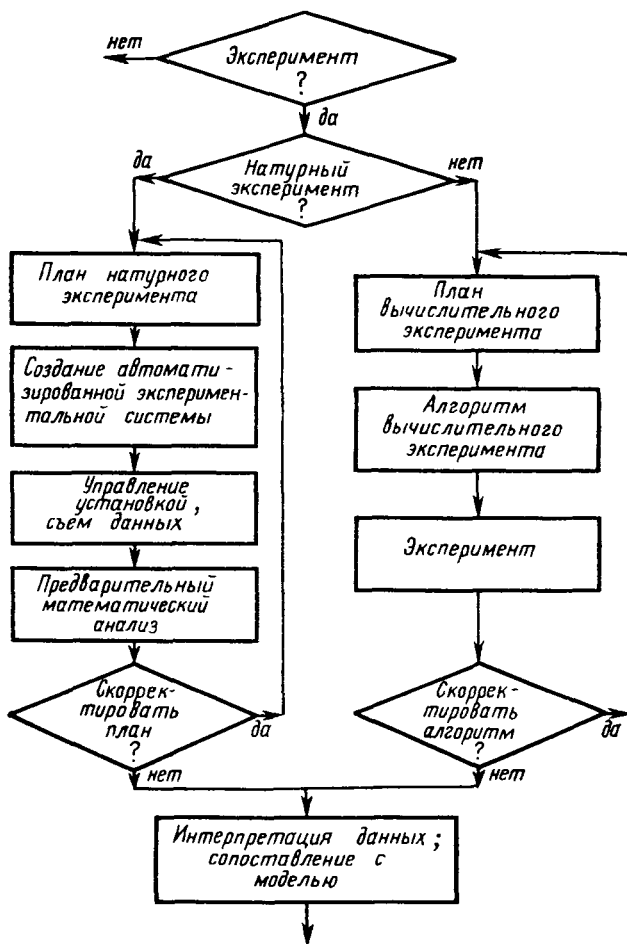


Рис. 139. Обобщенный алгоритм экспериментальной стадии биофизического исследования



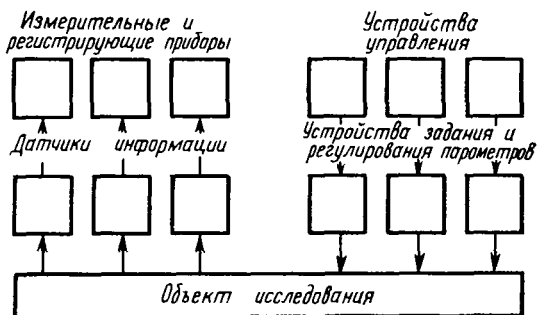


Рис. 140. Обобщенная схема установки для биофизического эксперимента

Рассмотрим более подробно этап, имеющий прямое отношение к автоматизации биофизического эксперимента, который проводится в режиме реального времени (т. е. в режиме, когда управление установкой, съем данных, их предварительный анализ, интерпретация получаемой информации, ее отображение, документирование и архивизация проводятся в едином, неразрывном во времени цикле).

На этапе натурального биофизического эксперимента основным средством исследования служит *экспериментальная установка* (рис. 140), в состав которой входят устройства и приборы для создания определенных экспериментальных условий и воздействий на исследуемый объект: датчики — устройства, обеспечивающие восприятие и извлечение первичной информации об объекте; измерительные приборы, обеспечивающие наблюдение за проведением изучаемого процесса, измерение и регистрацию информации об исследуемом объекте.

Определенные этапы управления установкой, воздействия на объект, преобразования и регистрации информации могут быть автоматизированы с помощью программных устройств с жестко заданной последовательностью действий. Однако для научных экспериментов из-за последовательного усложнения исследуемых моделей, по-

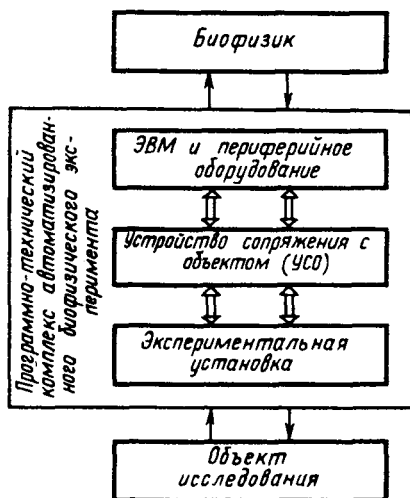


Рис. 141. Основные составляющие программно-технической системы автоматизации натурального биофизического эксперимента

становки новых задач, зависимости алгоритма эксперимента от получаемых в ходе анализа данных необходимо объединение отдельных автоматизированных устройств экспериментальной установки в единую программно-техническую систему, управляемую от ЭВМ. Наряду с ЭВМ и экспериментальной установкой в состав системы входит устройство сопряжения с объектом (УСО), обеспечивающее физическую и логическую связь ЭВМ и экспериментальной установки. Основные составляющие программно-технической системы автоматизированного биофизического эксперимента приведены на рис. 141. Конкретное программное и техническое наполнение автоматизированных комплексов для биофизических исследований рассмотрено в следующем разделе.

### § 3. Типовая система автоматизации биофизического эксперимента

Независимо от конкретного типа экспериментальной установки, структуры и состава используемых технических средств автоматизации процесс проведения эксперимента с помощью автоматизированной системы включает следующие этапы: измерение параметров аналоговых сигналов (амплитуды, частоты, длительности) и ввода их в ЭВМ; ввод цифровых сигналов в ЭВМ; преобразование и вывод управляющих цифровых сигналов из ЭВМ в аналоговом виде; математический анализ полученной в эксперименте информации; представление и отображение экспериментальных данных и результатов их обработки на ЭВМ в графическом виде на экране дисплея и графопостроителе; создание архива экспериментальных данных и результатов их обработки.

Характерной особенностью автоматизированного эксперимента является *диалоговый режим общения исследователя с системой*, который предусматривает периодическое повторение цикла, включающего выдачу машине задания, получение ответа и его анализ. Режим диалога наиболее эффективен при решении таких задач, программа которых в момент начала исследования не имеет однозначного варианта. Исследователь следит за процессом, фиксирует те или иные промежуточные результаты и по ходу решения задачи выдает ЭВМ инструкции, управляя ее работой. Наличие высокоразвитых средств диалога является одним из требований к системам автоматизации.

Основными функциональными элементами системы автоматизации являются ЭВМ и устройство сопряжения ЭВМ с объектом.

**ЭВМ.** На выбор ЭВМ для автоматизации эксперимента влияют разнообразные факторы, например функциональные возможности, низкая стоимость, малые габариты, программная совместимость с ЭВМ более высокого уровня, надежность в работе, возможность подключения различных вариантов периферийных устройств.

Бурное развитие электроники и вычислительной техники привело к тому, что в настоящее время для решения этих задач на первое место вышли микроЭВМ, заметно выигрывающие в отношении стоимости, доступности, габаритных размеров. Среди выпускаемых отечественной промышленностью микроЭВМ («Искра-1256», «Электроника С5-12», «Электроника ТЗ-16», «Электроника ДЗ-28» и др.) наиболее распространена «Электроника-60», которая наряду с общими достоинствами микромашины выгодно отличается программной совместимостью с 16-разрядными мини-ЭВМ типа СЗ-3, СМ-4, М-400, а также с наиболее распространенными ЭВМ зарубежного производства (PDP-11, LSI-11), что позволяет прямо использовать операционные системы, разработанные для этих ЭВМ, и обеспечивает преемственность и развитие программного обеспечения.

«Электроника-60» выделяется из всех микроЭВМ наличием серийно выпускаемых промышленностью устройств сопряжения с широким набором периферийного оборудования — электрифицированными пишущими машинами (ЭПМ) CONSUL-260, перфораторами ПЛ-150, фотосчитывателями FS-1501, накопителями на магнитных дисках ИЗОТ-1370, накопителями на гибких магнитных дисках «Электроника ГМД-70», накопителями на магнитной ленте ИЗОТ-5003, накопителями на компакт-кассетах РК, растровыми печатающими устройствами DZM-180, алфавитно-цифровыми дисплеями «Электроника-15ИЭ-00-013». К тому же для этой ЭВМ выпускаются платы постоянной перепрограммируемой и оперативной памяти, что обеспечивает свободу компоновки и гибкость структур в этой ЭВМ и позволяет расширять объем оперативной памяти до 56 Кбайт.

Процессор «Электроники-60» выполнен на базе больших интегральных схем (БИС). Система счисления двоичная; разрядность — 16; система команд — безадресная, одноадресная, двухадресная; емкость оперативного запоминающего устройства (ОЗУ) в базовом варианте — 4096 (4К) 16-разрядных слов; время обращения к ОЗУ — не более 700 нс; длительность цикла работы ОЗУ — не более 2,4 мкс; время выполнения двухадресной команды типа «Сложение» при регистровом методе адресации — 4 мкс.

**Приборный интерфейс.** К средствам сопряжения предъявляются требования независимости от типа ЭВМ, полной унификации связей между отдельными системами, возможности программного изменения структуры, свободы и гибкости компоновок и перспективного расширения системы с применением устройств, разработанных различными изготовителями аппаратуры. Существуют различные варианты решения этой проблемы, но наиболее полно указанным требованиям отвечает стандарт КАМАК (Computer Application to Measurement and Control). С 1980 г. системе КАМАК утверждена в качестве Госстандарта СССР.

Основными особенностями системы КАМАК являются модульный принцип построения, конструктивная однородность системы, обеспечивающая использование унифицированных конструкций, магистральная структура связей между функциональными блоками и применение принципов программного управления. В системе КАМАК нормализованы требования на конструкцию и размеры, электрические сигналы и логику. Система в целом и отдельные приборы выполняются в виде модулей, организованных по функциональному принципу. Отдельный блок (*крейт*) системы имеет размеры 262 × 486 × 573 мм. В крейте содержится 25 позиций с унифицированными 96 контактными разъемами для размещения 25 станций

(модулей). Две крайние правые позиции предназначены для размещения модуля, управляющего работой всего крейта (*крейт-контроллер*) и обеспечивающего «адаптацию» оборудования КАМАК к используемой ЭВМ. Остальные позиции предназначены для размещения штатных рабочих модулей. В задней части крейта в виде отдельного блока устанавливается источник питания. Крейты могут собираться в стойки при помощи соединительных колонок.

Габаритные размеры модуля одиночной ширины (1М)  $200 \times 293 \times 17,2$  мм. Допускается использование модулей шириной от 1 до 8 М. Конструкция модуля предусматривает монтаж в нем электронного оборудования на двусторонних печатных платах.

24 разъема крейта соединяются стандартным образом в так называемую *магистраль крейта*. Большинство соединений являются сквозными шинами, соединяющими соответствующие контакты разъемов у всех нормальных позиций модулей и части контактов крейт-контроллера. Имеются также индивидуальные шины, каждая из которых соединяет один из контактов разъема нормального модуля с одним контактом крейт-контроллера.

КАМАК — одноадресная система с непосредственной комбинированной адресацией данных. Форма адресуемой команды имеет вид  $N(i), A(j), F(k)$ , где  $N(i)$  — номер модуля, к которому адресуется команда;  $1 \leq i \leq 23$ ;  $A(j)$  — субадрес внутри модуля;  $0 \leq j \leq 15$ ;  $F(k)$  — функция, которую требуется выполнить.  $0 \leq k \leq 31$ .

Наряду с шинами, по которым передаются адресуемые команды, имеются шины, по которым передаются информация о состоянии объекта и сигналы общего управления.

Стандарт КАМАК отражает один из этапов в развитии средств связи ЭВМ с экспериментальной установкой, соответствующий как определенному уровню развития работ по автоматизации научных исследований, так и технологии производства радиоэлектронных компонентов. Значительно расширившийся в последние годы спектр применений средств автоматизации как в сторону систем со съемом и обработкой больших массивов информации, так и в сторону создания сравнительно небольших, но многочисленных вариантов систем обусловил дальнейшее развитие средств сопряжения. Одним из путей в этом направлении является эволюционное развитие стандарта КАМАК (стандарт COMPEX), другим — создание нового стандарта EUROBUS (связанное с заменой как логики, так и механики крейта). В третьем, наиболее радикальном, варианте FASTBUS предусматриваются полная смена всех компонентов; переход к сверхбыстродействующей магистрали; к логике, рассчитанной на мультипроцессорную, многокрейтовую обработку данных; к конструктивам, значительно увеличивающим размер печатных плат.

## Технические средства типового комплекса

Типовой комплекс автоматизации строится на базе микроЭВМ «Электроника-60» и однокрейтовой системы сопряжения с экспериментальной установкой (параллельная односекционная система с двумя общими магистральными каналами). Наличие двух общих магистральных каналов в системе, магистрали ЭВМ и крейта КАМАК— наиболее доступный в конкретных условиях способ связи с периферийными устройствами (по каналу ЭВМ или каналу КАМАК), а также с ЭВМ более высокой производительности. Структурная схема типового комплекса приведена на рис. 142.

Резидентная оперативная память процессора объемом 8 Кбайт расширена дополнительными платами оперативной памяти до 56 Кбайт. Для оперативного диалога исследователя с комплексом служит алфавитно-цифровой ди-

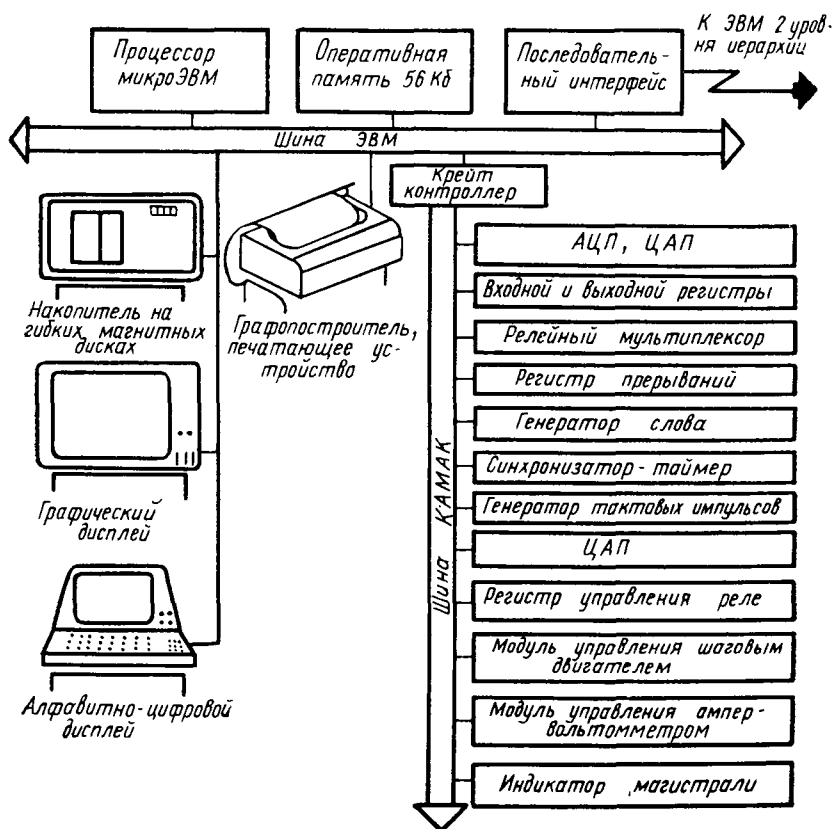


Рис. 142. Структурная схема технических средств типовой системы автоматизации

сплей. Для отображения графической информации в удобном для восприятия графическом виде может использоваться стандартный цветной телевизионный приемник, подключенный к магистрали ЭВМ через специальную интерфейсную плату и позволяющий представлять графики в четырех цветах на поле экрана, равном  $256 \times 256$  точек.

Для вывода на бумажный носитель протокола эксперимента, экспериментальных данных в графическом и цифровом виде, а также параметров, полученных в ходе математического анализа, в комплексе содержится устройство печати. В качестве системного устройства в комплекс входит накопитель на гибких магнитных дисках. Два дисководов накопителя дают возможность использовать одну дискетку для размещения операционной системы, а другую — для организации архива данных (информационная емкость одной дискетты составляет 256 Кбайт). Включение в состав комплекса накопителя на гибких дисках с практической точки зрения имеет принципиальное значение, так как обеспечивает возможность управления экспериментом и математического анализа полученных данных в автономном режиме. В то же время для программной и аппаратной поддержки комплексов нижнего уровня имеется канал связи магистрали «Электроника-60» с ЭВМ СМ-4.

Крейт КАМАК содержит необходимый набор модулей, реализующих основные функции по измерению сигналов, управлению установкой и контролю работы, аналогово-цифровые и цифро-аналоговые преобразователи, генераторы, счетчики, входные и выходные регистры, усилители с программно-регулируемым коэффициентом усиления, индикаторы магистрали, релейные мультиплексоры и т. д. Наличие широкого набора серийно выпускаемых модулей позволяет также включать в систему графические дисплеи, графопостроители, печатающие устройства по каналу КАМАК, что предпочтительнее с практической точки зрения.

## Программные средства типового комплекса

Программное обеспечение (ПО) автоматизированных комплексов предназначено для управления их работой в режиме измерений, математической обработки и архивизации результатов измерений, а также проверки работоспособности основных узлов.

К числу важных условий, которым должно отвечать специализированное программное обеспечение типовых комплексов автоматизации, следует отнести следующие.

1. Максимальная быстрота реакции ЭВМ на изменение условий эксперимента, обеспечивающая выработку управляющих воздействий на установку или исследуемый образец непосредственно в процессе измерений и в зависимости от получаемых результатов.

2. Проведение биофизических исследований на комплексе должно быть доступно пользователю, не знающему языков программирования, детальной структуры программного обеспечения и физической реализации в конкретной ЭВМ.

3. Функционально законченные режимы работы комплекса (запись спектра, кинетики, определение параметров спектра, преобразование и вывод информации на устройства отображения и т. д.) должны быть представлены в виде завершенных программных модульных структур, вызываемых к действию простым нажатием определенных клавиш на пульте оператора.

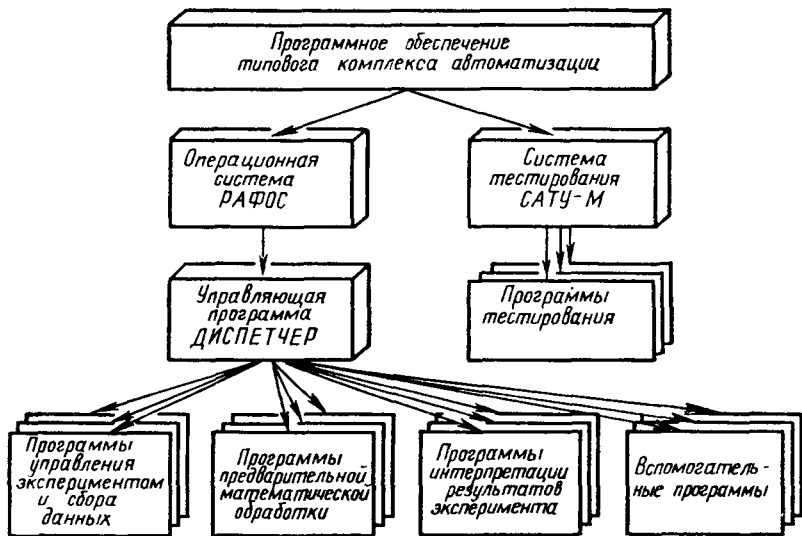


Рис. 143. Общая схема программных средств типового комплекса автоматизации

4. Запись экспериментальных данных при проведении эксперимента по любой методике, как и выполнение любой процедуры математической обработки, должна завершаться представлением экспериментальных данных в привычном исследователю графическом виде.

5. Создание обстановки активного участия исследователя в процессе проведения эксперимента с сохранением естественной формы взаимного общения с комплексом в виде «разговора». При этом специализированная прикладная система должна «подсказывать», что нужно сделать пользователю в зависимости от принятого им решения.

ПО состоит из операционной системы общего назначения, специализированной прикладной системы и системы тестирования КАМАК-оборудования. Общая структура ПО типового комплекса представлена на рис. 143.

В качестве системного ПО типового комплекса из всего множества системного ПО, разработанного для микроЭВМ «Электроника-60» и ЭВМ серии СМ, целесообразно использовать операционную систему (ОС) реального времени РАФОС, предоставляющую пользователю наибольшие возможности и удобства при разработке и эксплуатации прикладных программ обслуживания экспериментов и математической обработки данных и обеспечивающую необходимый режим функционирования прикладной системы. Программная и аппаратная совместимость микроЭВМ «Электроника-60» и ЭВМ серии СМ (СМ-3, СМ-4) позволяет взять в качестве базовой ОС комплекса версию РАФОС, использующую в качестве внешней памяти гибкие магнитные диски.

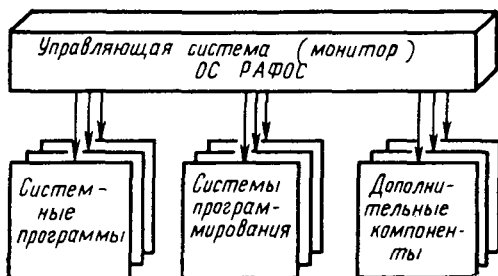


Рис. 144. Структурно-функциональная схема операционной системы РАФОС

ОС РАФОС имеет следующую структуру: управляющая система, системные программы, системы программирования, дополнительные компоненты (рис. 144).

Ядром управляющей системы РАФОС является *монитор* — программная часть, контролирующая управление системой. Его резидентный компонент (в зависи-

мости от класса монитора) занимает оперативную память от 2 до 7 Кслов (одно машинное слово составляет 16 двоичных разрядов). Монитор обеспечивает работу с таймером (часами), организацию ввода/вывода, ведение системы файлов на внешних запоминающих устройствах, диалог с оператором, диагностику ошибок.

ОС РАФОС имеет три класса мониторов: однозадачный монитор (SJ), фоново-оперативный монитор (FB), монитор управления расширенной памятью (XM).

*Однозадачный монитор* функционирует при минимальной конфигурации технических средств, занимая 2Кслов оперативной памяти, и обеспечивает работу системы с оперативной памятью от 8 до 28Кслов. Он обладает наибольшим быстродействием, поэтому целесообразно его использовать для решения задач, требующих большой скорости передачи данных. SJ-монитор программно-совместим снизу вверх с FB- и XM-мониторами.

*Фоново-оперативный монитор* занимает 4Кслов оперативной памяти ЭВМ и обеспечивает работу системы на конфигурации от 12 до 28 Кслов оперативной памяти. Он предназначен для одновременного выполнения двух задач: фоновой и оперативной. Обе задачи могут быть программами реального времени.

*XM-монитор* — это расширение FB-монитора, которое позволяет использовать оперативную память свыше 28 Кслов в оперативной и (или) фоновой задаче. XM-монитор предполагает наличие аппаратного диспетчера памяти и обеспечивает 18-битную адресацию для операции ввода/вывода и набора макрокоманд, позволяющих фоновой и (или) оперативной задачам адресовать память до 124 Кслов. XM-монитор занимает 7 Кслов оперативной памяти и обеспечивает работу с системой, имеющей от 32 до 124 Кслов памяти, что дает возможность писать программы на языках высокого уровня, например ФОРТРАН-IV, использующих большие массивы данных (общим размером до 96 Кслов).

Системные программы, входящие в состав ОС РАФОС, позволяют выполнять разнообразные функции по обслуживанию системы:



копирование, объединение, переименование и удаление файлов, распечатку каталогов файлов, компоновку объектных программных модулей и библиотек в выполняемые программы (формат загрузки); создание, коррекцию и обслуживание библиотек объектных модулей, отладку в интерактивном режиме программ, написанных на Макроассемблере и ФОРТРАНе; компоновку, коррекцию и загрузку программ в абсолютном двоичном формате.

В состав ОС РАФОС входят такие системы программирования, как Макроассемблер, ФОРТРАН-IV, БЭЙСИК. Таким образом ОС РАФОС представляет собой развитую инструментальную систему, что и позволило разработать на ее основе открытую для расширения специализированную систему программного обеспечения типовых комплексов. Специализированная система функционирует в диалоговом режиме, что создает максимальные удобства и упрощает работу исследователя по управлению экспериментом и последующему анализу экспериментальных данных.

Модульность аппаратной реализации основных функций комплекса послужила предпосылкой разработки программных модулей для их обслуживания; каждой подсистеме в комплексе выделен исчерпывающий набор простейших операций, оформленных в виде подпрограмм на ФОРТРАНе. Специализированные программы, входящие в состав прикладной системы, являются реализациями вполне законченных алгоритмов функционирования комплексов, имеющих самостоятельное значение.

Работой всей прикладной системы в рамках ОС РАФОС управляет *программа-диспетчер* в режиме диалога с исследователем, осуществляемого посредством алфавитно-цифрового графического дисплея. Кроме программы-диспетчера в состав прикладной системы ПО типового комплекса автоматизации входят программы управления экспериментом и сбора данных, программы математического анализа результатов измерений, вспомогательные программы (см. рис. 143).

Программы управления и сбора данных эксперимента являются наиболее оригинальной и ответственной частью специализированной прикладной системы комплекса. Создание программ управления экспериментом требует не только знания структуры используемой ЭВМ, языков программирования, всех тонкостей системы КАМАК, но и глубокого знания архитектуры комплекса автоматизации и экспериментальной установки, специфики объекта и сути изучаемого процесса или явления, физических процессов, лежащих в основе проводимых исследований. Все эти сведения являются предпосылкой для качественного создания соответствующих программных модулей. Операции, имеющие в своем составе КАМАК-функции, оформлены в виде подпрограмм на Макроассемблере. Приоритет при обслуживании ЛАМ-запросов модулей КАМАК задается соответствующим распределением векторов прерывания в

крейте и операциями маскирования ЛАМ-запросов на уровне крейт-контроллера и модулей.

Алгоритмы математической обработки экспериментальных данных также разбиваются на не зависимые и не делимые далее модули, оформленные в виде отдельных прикладных программ на уровне объектных модулей ОС РАФОС. В базовый набор программ математической обработки типового комплекса входят программы цифровой фильтрации (сглаживания), интегрирования, дифференцирования, определения экстремумов, вычитания, анализа кинетики переходных процессов, сравнения спектров и др.

Вспомогательные программы позволяют записывать массивы экспериментальных и расчетных данных в архив, выводить в виде графика на экране графического дисплея, устройств печати и передавать на ЭВМ большей производительности СМ-4 для более сложной математической обработки.

Созданный таким образом набор стандартных программ в структуре объектных модулей ОС РАФОС в дальнейшем используют при компоновке специализированных прикладных программ наряду со стандартными модулями ФОРТРАНа и Макроассемблера ОС РАФОС.

Работа на автоматизированном комплексе при описанной структуре программных средств производится следующим образом. При включении микроЭВМ автоматически загружается в оперативную память операционная система РАФОС. По окончании загрузки ОС происходит обращение к командному файлу, что приводит к автоматическому вызову программы-диспетчера. В свою очередь, программа-диспетчер вызывает на экран пульта оператора таблицу режимов работы комплекса (т. е. перечень всех видов автоматической работы данного комплекса под управлением ЭВМ) и ждет команды оператора. Командой комплексу является число, соответствующее порядковому номеру выбранного исследователем режима работы, которое набирают на пульте оператора и вводят в ЭВМ нажатием клавиши «ВК». После выполнения в автоматическом режиме всех операций, предусмотренных данной программой, управление передается программе-диспетчеру, которая вновь вызывает на экран пульта оператора таблицу режимов работы.

При работе прикладной системы супервизор монитора ОС РАФОС производит диагностику ошибок при сбойных ситуациях, не допуская «зависания» прикладной системы, и обеспечивает работу с таймером, что позволяет на экране оператора высвечивать текущее время.

Для набора статистики, возможности проведения повторной обработки, сравнения и классификации информации при однотипных экспериментах и математическом моделировании существует возможность записи экспериментальных данных в архив, организованный на дискете пользователя. Запись результатов эксперимен-

та на дискетту пользователя и считывание их в оперативную память микроЭВМ «Электроника-60» производится в файловой структуре специальными программами архивизации прикладной системы.

#### § 4. Программно-технический комплекс ЭПР-спектроскопии

Автоматизированный ЭПР-спектрометр — один из конкретных примеров современных программно-технических комплексов для проведения автоматизированного биофизического эксперимента.

Структурная схема технических средств комплекса представлена на рис. 145.

По функциональному назначению часть комплекса, связанная с управлением установкой, состоит из четырех подсистем, специфичных только для автоматизации ЭПР-исследований: подсистемы измерения магнитного поля, подсистемы развертки поля, подсистемы измерения частоты источника микроволнового излучения базового радиоспектрометра РЭ-1307 и подсистемы управления дополнительными устройствами, необходимыми для проведения фотобиологических исследований.

Для обеспечения высокой точности измерений в ЭПР-спектрометре был применен оригинальный вариант ЯМР-магнитометра, который собран на стандартной макетной плате.

Датчик магнитного поля представляет собой катушку индуктивности, намотанную на ампуле с водным раствором LiCl и расположенную между по-

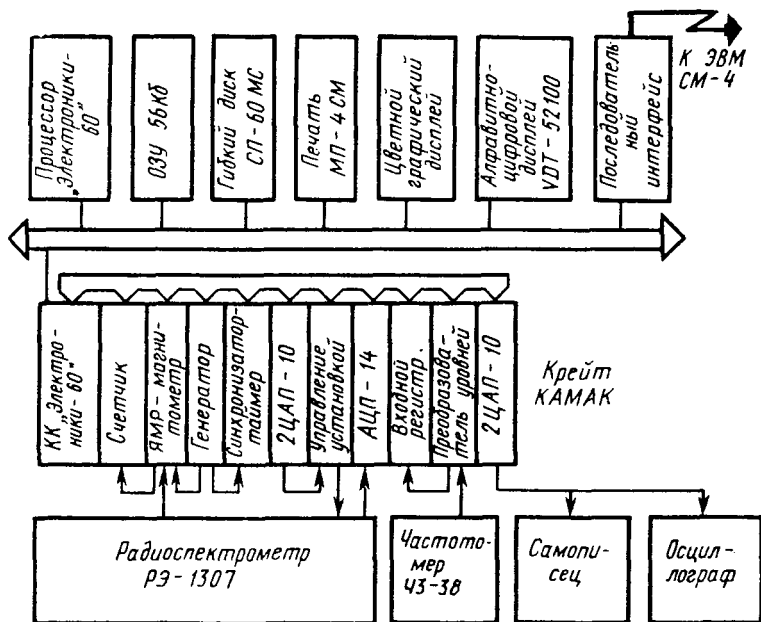


Рис. 145. Структурная схема технических средств комплекса ЭПР-спектроскопии (объяснение см. в тексте)

люсами магнита. В основе работы датчика лежит явление ЯМР протонов вещества, помещенного в ампуле датчика. При этом напряженность измеряемого магнитного поля ( $H$ ) определяется по формуле  $H = 2 \pi f / \gamma$ , где  $f$  — частота ЯМР;  $\gamma$  — гиромагнитное отношение для протонов.

Магнитометр выполнен по схеме автодинного спинового детектора, резонансная частота которого перестраивается варикапом с помощью автоматической системы определения условий ЯМР. Сигнал высокой частоты, пропорциональный измеренной напряженности магнитного поля, вырабатывается ЯМР-магнитометром, преобразуется счетчиком с помощью генератора в двоичный 16-разрядный параллельный код и вводится в микроЭВМ «Электроника-60» по программному каналу. Автоматический ЯМР-магнитометр, генератор импульсов типа 730А и 16-разрядный счетчик составляют подсистему измерения магнитного поля спектрометра, обеспечивающую автоматическое измерение магнитного поля в диапазоне  $0,15 \div 0,4$  Тл с максимальной скоростью слежения за изменением напряженности  $0,008$  Тл/с. Относительная точность измерения напряженности магнитного поля составляет  $10^{-6}$ . При наличии сменных датчиков, отличающихся величиной индуктивности катушек, диапазон измерения магнитных полей может быть расширен от  $0,25$  до  $1$  Тл.

Управление магнитным полем обеспечивается подсистемой развертки поля, в которую кроме ЭВМ и крейт-контроллера входят модуль цифро-аналогового преобразователя 2 ЦАП-10 и модуль оригинальной разработки «Управление установкой». Для получения симметричной развертки относительно предварительно установленной величины магнитного поля выходы двух цифро-аналоговых преобразователей модуля 2 ЦАП-10 подключены к разноименным входам суммирующего операционного усилителя модуля «Управление установкой». Таким образом, для увеличения магнитного поля относительно среднего значения ЭВМ управляет работой первого цифро-аналогового преобразователя, для уменьшения магнитного поля — второго. Число возможных шагов (дискретов) развертки в одну сторону составляет 1024.

Среднее значение магнитного поля устанавливается с помощью стандартных переключателей блока управления величиной магнитного поля спектрометра, при этом значении величины поля визуально контролируется на экране дисплея. Для измерения масштаба одного дискрета развертки поля и соответственно для измерения амплитуды развертки на передней панели модуля «Управление установкой» предусмотрен переключатель диапазонов развертки.

Подсистема измерения напряженности магнитного поля, подсистема развертки поля и система установки тока электромагнита радиоспектрометра в совокупности образуют прецизионную безгистерезисную систему управления магнитным полем. Применение такой системы позволяет устанавливать с высокой точностью магнитное поле требуемой напряженности и осуществлять программно-управляемую развертку поля по заданному закону изменения в диапазонах  $\pm 5; \pm 10; \pm 20; \pm 50; \pm 100$  мТл с дискретностью развертки поля  $0,005; 0,01; 0,02; 0,05; 0,1$  мТл.

Для точности определения условий ЭПР необходимо знать не только значение напряженности магнитного поля, но и частоту СВЧ-энергии, поглощаемой исследуемым образцом. Для этого рабо-

чую частоту клистрона радиоспектрометра РЭ-1307 измеряют частотомером ЧЗ-38 с приставкой ЯЗЧ-43. По требованию ЭВМ происходит запуск частотомера и ввод измеренного значения частоты посредством модулей «Преобразователь логических уравнений» и «Входной регистр-305» в магистраль КАМАК, а затем в ЭВМ.

Входной сигнал прибора преобразуется аналого-цифровым преобразователем АЦП-14 с временем выборки 20 мкс и временем преобразования 2 мс. Подсистема управления дополнительными устройствами служит для включения и выключения в программно-заданные моменты времени устройств, необходимых для проведения конкретных экспериментов (источник возбуждающего света, регуляторы температуры, смесители, дозаторы и т. д.). Подсистема состоит из устройств дешифрования и усиления команд ЭВМ, расположенных конструктивно в модуле «Управление установкой».

Программное обеспечение комплекса ЭПР-спектроскопии, выполненное в соответствии с типовой структурой, обеспечивает управление работой комплекса в режиме измерений, математическую обработку, оперативное отображение и архивизацию результатов измерений, а также проверку работоспособности основных узлов. При включении ЭВМ «Электроника-60» автоматически происходят загрузка в оперативную память ЭВМ операционной системы, вызов программы-диспетчера и отображение на экране алфавитно-цифрового дисплея набора режимов работы комплекса.

### Режимы работы комплекса

1 — запись спектра	2 — регистрация кинетики
3 — интегрирование	4 — анализ кинетики
5 — вычитание спектров	6 — сглаживание
7 — определение параметров спектров	8 — вывод на графдисплей
9 — вывод на экран осциллографа	10 — вывод на самописец
11 — вывод на принтер	12 — обращение к архиву
13 — передача данных на СМ-4	99 — конец работы

Обобщенная схема проведения экспериментов на комплексе приведена на рис. 146. Учитывая, что при весьма широком разнообразии биофизических исследований, проводимых методами спектроскопического анализа, процесс регистрации экспериментальных данных сводится к записи спектров исследуемых соединений или кинетики изменения их концентрации, программа обслуживания экспериментов обеспечивает два вида автоматической работы комплекса: проведение исследований, в результате которых происходит запись спектра ЭПР (программа SPECTR), и проведение экспериментов, связанных с измерением и регистрацией кинетики ЭПР-сигналов (программа KINET). При этом обе программы обеспечивают как однократную запись, так и накопление сигналов в заданном диапазоне спектра или интервале времени. Программы SPECTR и

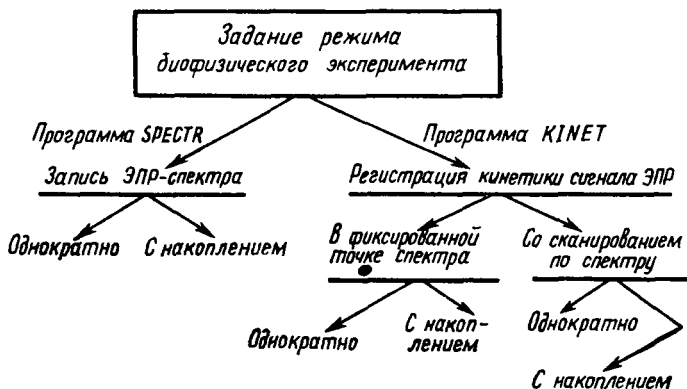


Рис. 146. Обобщенная схема проведения эксперимента на комплексе ЭПР-спектроскопии

KINET состоит из двух частей: в первой части происходит настройка программ на эксперимент, вторая часть обеспечивает непосредственное проведение измерений без вмешательства оператора.

Ниже подробно рассмотрен алгоритм программы управления комплексом в режиме записи спектра. Схема программы SPECTR приведена на рис. 147.

В соответствии с таблицей режимов программа SPECTR вызывается нажатием клавиши «1» на пульте алфавитно-цифрового дисплея. На первом этапе после вызова программы производится настройка комплекса на работу по записи спектра в режиме диалога с исследователем. При этом программа проверяет, включен ли радиоспектрометр в режим автоматического управления от ЭВМ. Если управление радиоспектрометром не включено, на экран пульта оператора выводится сообщение «Включите управление установкой» и программа переходит в режим ожидания. Исследователь должен включить тумблер управления, расположенный на модуле «Управление установкой».

Если управление радиоспектрометром включено, то программа автоматически производит: определение установленного диапазона развертки магнитного поля; размаскирование и приведение в рабочее состояние аппаратуры КАМАК; периодическое измерение и вывод значений напряженности магнитного поля в правый верхний угол экрана; вывод на экран пульта оператора сообщения исследователю в виде следующих команд:

« $H = XXXX, XX$  ГС».

«Диапазон развертки магнитного поля —  $XXX$  ГС».

«Проверьте и выставьте регулировки управления радиоспектрометра и комплекса».

«Установите напряженность магнитного поля».

«Введите число накоплений».

«Нажмите клавишу «ВК»».

По получении сообщения исследователь должен проверить и при необходимости настроить приемный и СВЧ-тракты радиоспектрометра, установить необходимое значение напряженности магнитного поля переключателями «Магнитное поле эрстеда» радиоспектрометра, установить необходимый диапазон развертки магнитного поля переключателем «Диапазон» модуля «Управление установкой», ввести требуемое число накоплений  $N$  и нажать клавишу «ВК».

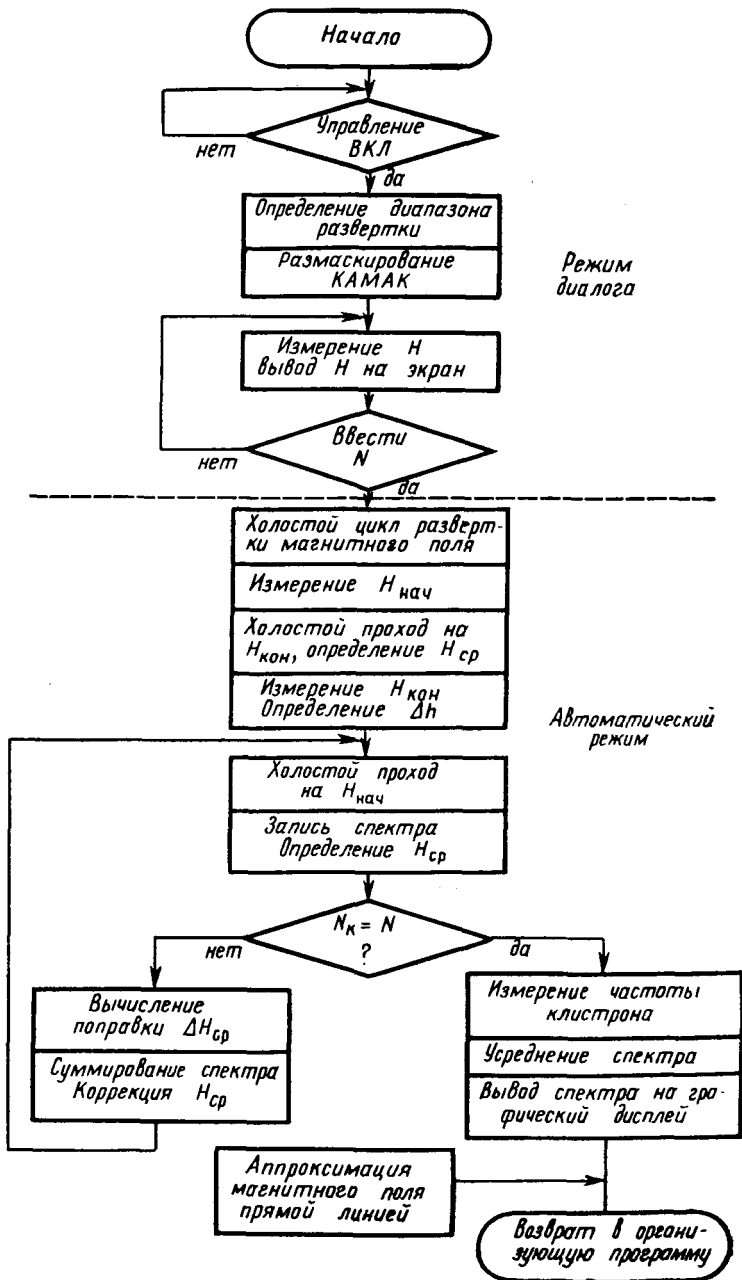


Рис. 147. Схема программы

После этого программа обеспечивает работу комплекса по записи спектра ЭПР в автоматическом режиме, не требуя вмешательства исследователя. Процесс записи спектра включает следующие операции, показанные на рис. 147. Вычисление напряженности магнитного поля в середине развертки  $H_{ср}$  проводят по формуле:  $H_{ср} = \sum_{i=1}^M (H_i/M)$ , где  $H_i$  — значение напряженности магнитного поля, измеренное на  $i$ -м шаге развертки;  $M = 1024$  — число шагов развертки магнитного поля.

Затем измеряют напряженность магнитного поля в конечной точке развертки  $H_{нов}$ , шаг развертки ( $\Delta h$ ) вычисляют по формуле:

$$\Delta h = \frac{2 \sum_{i=1}^{M/2} (H_{2i-1} - H_{2i})}{M},$$

где  $H_{2i-1}$  и  $H_{2i}$  — значения напряженности магнитного поля, измеренной на нечетных и четных шагах развертки соответственно.

Далее программа обеспечивает холостой проход на начало развертки; рабочий проход развертки магнитного поля с измерением и запоминанием величины сигнала ЭПР и напряженности магнитного поля на каждом шаге развертки и вычислением  $H_{ср}$ ; проверку числа произведенных циклов записи спектра. Если число циклов не равно заданному  $N$ , то происходят определение поправки  $\Delta H_{ср}$  и коррекция развертки магнитного поля, преобразование спектра из целочисленных значений в формат числа с плавающей запятой и перепись с суммированием спектра в определенную часть памяти ЭВМ, используемую как аккумулятор. Затем цикл записи спектра повторяется.

Если записанный спектр был последним  $N_k = N$ , то производится измерение частоты  $\nu$  СВЧ-энергии клистрона; усреднение спектра; вывод спектра на экран графического дисплея для визуального контроля и аппроксимация измеренных значений напряженности магнитного поля  $H_i$  прямой линией:  $H'_i = Ai + B$ , где  $H'_i$  — пересчитанные значения магнитного поля;  $i = 1, 2, \dots, M$ ;  $M$  — количество отсчетов напряженности магнитного поля.

Обращение спектра на экране происходит до тех пор, пока исследователь не нажмет клавишу «ВК» на пульте оператора, после чего вывод спектра прекращается и происходит возврат в программу-диспетчер, которая выводит на экран пульт оператора таблицу режимов работы комплекса. После этого в зависимости от конкретно поставленной цели исследователь может прекратить работу, записать данные в архив, записать график в виде твердой копии на бумаге, подвергнуть полученные данные любому виду математической обработки в соответствии с имеющимися программами.

Математическое обеспечение комплекса включает *базовый набор программ*: цифровой фильтрации (сглаживания) экспериментальных данных, определения параметров спектра, интегрирования, дифференцирования, вычитания и суммирования, анализа кинетики переходных процессов, моделирования спектров ЭПР. Последние две программы позволяют довести анализ экспериментальных данных до получения математической модели, описывающей исследуемый процесс.

Программа математического анализа кинетики переходных процессов позволяет вычислить параметры модели для случая, когда переходный процесс может быть представлен в виде суммы экспонент. В ходе анализа определяются показатели экспонент (величина, обратная константе скоростей протекающих реакций), началь-





Рис. 148. Кинетика темного восстановления фотоокисленного катион-радикала бактериохлорофилла (оригинальная запись регистрируемого сигнала и протокола математического анализа)

ные концентрации реагентов и среднеквадратичная ошибка. На рис. 148 приведены оригинальная запись кинетики темного восстановления фотоокисленного катион-радикала бактериохлорофилла, полученная на комплексе под управлением программы KINET, и результаты математического анализа этой кривой на ЭВМ с помощью программы анализа кинетики переходных процессов. ЭВМ выводит следующую информацию:

#### СИСТЕМА ПОИСКА Э П Р

РЕАЛЬНЫЙ МАСШТАБ ГРАФИКА

МАКСИМУМ = 955 МИНИМУМ = 695 АМПЛИТУДА = 260

KINET.998, TEM-120, TIME 15,

NO TIME CONST, ACCUM 100,

IMP LAMP

1. ВЫВОД РЕЗУЛЬТАТОВ : c = 685

A = 225, 25331 G1 = -0.01052 ERROR = 16.82853

N	G1	G2	A1	A2	ERROR
---	----	----	----	----	-------

26	-0.00052	-0.02048	23.96071	240.04871	2.97213
----	----------	----------	----------	-----------	---------

## 2. ВЫВОД РЕЗУЛЬТАТОВ: $c = 680$

A = 229.12296	G1 =	-0.00920	ERROR =	20.75949		
N	G1	G2	A1	A2	ERROR	
25	-0.01880	-0.00029	248.68269	26.71851	3.95814	

## 3. ВЫВОД РЕЗУЛЬТАТОВ: $c = 689$

A = 231.54625	G1 =	-0.01174	ERROR =	13.81586		
N	G1	G2	A1	A2	ERROR	
27	-0.02050	-0.00067	239.85002	20.11756	2.97106	

При анализе спектров ЭПР реализован иной подход — параметры модели задают на основе априорных сведений, по ним рассчитывают модельный спектр, сопоставляемый с экспериментальным. Модельный и экспериментальный спектры «подгоняются» и отождествляются после того, как их отличие становится менее заданной ошибки.

## § 5. Порядок работы на программно-техническом комплексе ЭПР-спектроскопии

Программное обеспечение комплекса функционирует под управлением операционной системы РТ-11 (РАФОС). В связи с этим, перед тем как приступить к работе на комплексе, рекомендуется ознакомиться с командами монитора операционной системы РАФОС. Кроме того, необходимо прочитать инструкцию по работе на ЭПР-спектрометре РЭ-1307.

**Включение и запуск комплекса.** 1. Включить стойку нажатием кнопки, находящейся в правом верхнем углу, при этом загорается лампа сигнализации включения питания.

2. Включить радиоспектрометр в последовательности: включить тумблер «Стойка»; включить тумблер «Магнит».

3. Включить крейт КАМАК переводом тумблера крейта в верхнее положение. О включении питания сигнализирует лампа.

4. В левый дисковод ( $DX_0$ ) накопителя на гибком магнитном диске вставить системный диск, на котором находятся ОС и загрузочный модуль необходимой программы, в правый ( $DX_1$ ) — рабочий диск. Для предохранения выхода из строя накопителя на магнитном диске и гибких дисков рекомендуется ознакомиться с правилами их эксплуатации. Соответственно рабочим сторонам дисков нажимаются кнопки определения рабочих сторон на панели накопителя на дисках (на панели приведены схематические правила).

5. Включить дисплей переводом тумблера, находящегося на обратной стороне корпуса. Нажать клавиши «ON-LINE» и «ROLL».

6. Включить ЭВМ «Электроника-60» путем последовательного перевода в вертикальное положение клавиш «Программа» и «Питание», находящихся на пульте. Признаком включения является по-

явление изображения на экране графического дисплея и таблицы загрузки ОС на экране алфавитно-цифрового дисплея.

7. Ввести дату и время, например 22-ФЕВ-88, 12:52:55.

8. Появление точки на дисплее означает готовность монитора ОС к работе. Программы регистрации спектра, кинетики и моделирования вызываются R ESR; R KINET; R LABEL соответственно.

Любой ввод информации в ЭВМ заканчивается нажатием клавиши «RETURN».

**Регистрация и анализ спектров ЭПР.** После вызова программы на экране дисплея высвечивается меню с возможными режимами работы. Нажать клавишу, соответствующую номеру выбранного режима работы (любой ввод информации в ЭВМ заканчивается нажатием клавиши «RETURN», поэтому здесь и далее эта операция не упоминается). Для выхода из программы (конец работы) ввести 99. Рассмотрим принципы работы программ, обеспечивающих режимы перечисленные в меню.

### *1. Запись спектра*

Программа загружается после ввода 1 во время выбора режима работы. Если не включен тумблер «На линии» модуля управления установкой, на дисплее высвечивается сообщение: ВКЛЮЧИТЕ ТУМБЛЕР «На линии», пока тумблер не будет включен. Установить диапазон изменения магнитного поля ручкой на ЯМР-магнитометре 32;  $32 \times 2$ ;  $32 \times 4$ ;  $32 \times 8$  Гс (обычно работают на диапазоне  $100 \div 140$  Гс).

Затем программа считывает и высвечивает установленное значение магнитного поля. Исследователю предоставляется возможность в случае необходимости корректировать напряженность магнитного поля (соответствующую середине развертки) с помощью ручек на передней панели РЭ-1307, наблюдая корректированные значения на дисплее. Когда выставлена необходимая напряженность магнитного поля, следует нажать клавишу «RETURN». Надо отметить, что считанные значения напряженности магнитного поля корректны только при автоматическом режиме работы ЯМР-магнитометра (о чем свидетельствует загорание красной лампы на передней панели модуля).

**1.1. ВВЕДИТЕ ЧИСЛО НАКОПЛЕНИЙ.** Следует ввести целое число, соответствующее выбранному числу накоплений. В случае ввода 0 происходит перевод на окончание программы (см. п. 1.4).

**1.2. ВВЕДИТЕ СКОРОСТЬ РАЗВЕРТКИ.** Необходимо ввести число, соответствующее требуемой скорости сканирования магнитного поля (от 1 до 99). Скорость 25 соответствует прохождению 1024 точек за время  $\sim 4$  мин ( $50 \sim 8$  мин и т. д.). При вводе 0 происходит переход на окончание программы (см. п. 1.4).

Программа высвечивает предварительные данные о параметрах развертки магнитного поля и обеспечивает автоматическую регистрацию спектра. В случае срыва автоматического слежения магнитометра нужно дождаться конца работы.

На графическом дисплее высвечиваются регистрируемые данные. После того как зарегистрированы данные, на экране высвечивается: РАБОТА ПРОДОЛЖАЕТСЯ — и производится сканирование магнитного поля (холостое) на начало развертки.

По окончании сканирования магнитного поля красным цветом выводится кривая развертки магнитного поля, зеленым — спектр, на алфавитно-цифровой дисплей — цифровые параметры развертки.

### 1.3. ВЫБЕРИТЕ РЕЖИМЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАБОТЫ.

1. НОВОЕ НАКОПЛЕНИЕ (выбор этого режима означает выход на программу записи спектра); 2 — КОНЕЦ РАБОТЫ БЕЗ КОРРЕКЦИИ БАЗОВОЙ ЛИНИИ; 3 — КОНЕЦ РАБОТЫ С КОРРЕКЦИЕЙ БАЗОВОЙ ЛИНИИ. Оператору необходимо ввести число от 1 до 3, соответствующее номеру выбранного режима. В случае ввода 0 происходит переход на окончание программы (см. п. 1.4). При выборе первого режима происходит переход на начало (см. п.1). В случае выбора режима 2 и 3 происходит переход на следующий этап (причем в режиме 3 после коррекции базовой линии).

1.4. СПЕКТР ЗАПИСАТЬ НА ДИСК? (ДА — 1, НЕТ — 0). Ввести 1 для записи. Далее согласно «Запись спектра на диск» (см. п. 5.3). При вводе 0 происходит выход из программы и высвечивается меню.

#### 2. Сглаживание

2.1. ВВЕДИТЕ НАЗВАНИЕ ФАЙЛА В ВИДЕ НННFFF (см. п. 5.2).

2.2. ВВЕДИТЕ ЧИСЛО СГЛАЖИВАНИЙ: Ввести целое число, соответствующее выбранному количеству сглаживаний (от 1 до 999, учитывая, что одно сглаживание идет ~1 мин). На графическом дисплее контрастно двумя цветами выводится спектр до сглаживания и на него накладывается другим цветом сглаженный спектр.

2.3. РЕЗУЛЬТАТ ЗАПИСАТЬ НА ДИСК?. Если да, ввести 1 и далее согласно п.5.3. Если нет, ввести 0, при этом происходит выход из программы и на дисплее высвечивается меню.

#### 3. Интегрирование

3.1. ВВЕДИТЕ НАЗВАНИЕ ФАЙЛА В ВИДЕ НННFFF (см. п. 5.2).

3.2. РАБОТА ПРОДОЛЖАЕТСЯ — программа производит коррекцию базовой линии. Исследователь должен ждать вопроса системы.

3.3. ВВЕДИТЕ ПОПРАВКУ ЛЕВОЙ МЕТКИ. Ввести целое число, соответствующее шагу и направлению циклического движения левой метки (знак минус перед числом показывает направление влево). При интегрировании всего спектра, а не отдельного участка, ограниченного метками, в ответ на этот запрос нажать клавишу «RETURN». В том случае, когда необходимо ограничить участок интегрирования метками и введено число, определяющее шаг движения, для остановки движения метки нажать клавишу «RETURN», после чего вновь будет задан запрос (см. п.3.3). При необходимости

корректировки положения метки ввести число, в противном случае нажать клавишу «RETURN». Начальное положение левой метки в точке 1.

3.4. ВВЕДИТЕ ПОПРАВКУ ПРАВОЙ МЕТКИ. То же самое, что и в п. 3.3, за исключением начального положения правой метки в точке 256 (в соответствии с размером изображения на экране графического дисплея 256 × 256 точек).

3.5. Числовое значение второго интеграла высвечивается на дисплее. На экране графического дисплея контрастно двумя цветами выводится первый интеграл (кривая поглощения), на него синим цветом накладывается кривая, соответствующая второму интегралу линии спектра.

3.6. РЕЗУЛЬТАТ ЗАПИСАТЬ НА ДИСК. Если да, ввести 1 и далее согласно п. 5.3., в противном случае ввести 0. После этого происходит выход из программы и на дисплее высвечивается меню.

#### 4. Вывод на самописец

4.1. ВВЕДИТЕ НАЗВАНИЕ ФАЙЛА В ВИДЕ НННFFF (см. п. 5.2).

4.2. ВЫБЕРИТЕ МАСШТАБ ВЫВОДА СПЕКТРА ... Ввести число, соответствующее выбранному масштабу. При вводе 0 происходит выход из программы в меню.

4.3. УСТАНОВИТЕ 0, СКОРОСТЬ 4, ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ 24, ВКЛЮЧИТЕ САМОПИСЕЦ и НАЖМИТЕ ВК. С помощью соответствующих ручек самописца радиоспектрометра установить 0, скорость протяжки ленты 4, нажать клавишу чувствительности 24, запустить протяжку ленты и нажать клавишу «RETURN».

*Примечание.* Тумблер «На линии» модуля управления установкой должен быть в верхнем (включенном) положении. Для прерывания процесса вывода спектра на самописец выключить его и нажать клавишу «RETURN», при этом происходит выход из программы в меню.

4.4. ВЫКЛЮЧИТЕ САМОПИСЕЦ И НАЖМИТЕ ВК. Остановить протяжку ленты и нажать клавишу «RETURN». Происходит выход из программы в меню.

#### 5. Обращение к архиву

5.1. ВЫБЕРИТЕ РЕЖИМ РАБОТЫ 1 — ЧТЕНИЕ С ДИСКА, 2 — ЗАПИСЬ НА ДИСК. Ввести число, соответствующее номеру выбранного режима. При вводе 0 происходит выход из программы в меню.

#### 5.2. Считывание с диска.

5.2.1. ВВЕДИТЕ НАЗВАНИЕ ФАЙЛА В ВИДЕ НННFFF. Ввести идентификатор файла в символьном виде. Например, если файл называется ESR CCC001, следует ввести CCC001. На дисплее высвечиваются комментарий, введенный при записи спектра, и параметры развертки магнитного поля.

5.2.2. ОЧИСТИТЬ ЭКРАН? ДА — ввести 1, НЕТ — ввести 0.

5.2.3. ВЫБЕРИТЕ ЦВЕТ : 1 — КРАСНЫЙ, 2 — СИНИЙ, 3 — ЗЕЛЕНый. Ввести цифру, соответствующую номеру выбранного цвета. На экране графического дисплея должен высветиться спектр.

5.3. Запись спектра.

5.3.2. ВВЕДИТЕ НАЗВАНИЕ ФАЙЛА В ВИДЕ НННFFF. Ввести набор символов, как в п.5.2.1.

5.3.2. ВВЕДИТЕ СТРОКУ КОММЕНТАРИЯ. Ввести комментарий из любых символов (максимальное число символов в строке — 60, строк — 5), и этот запрос делается последовательно 5 раз). Если нет необходимости ввода комментария, надо нажать клавишу «RETURN». Программа автоматически организует на диске файл с указанным идентификатором и записывает в него комментарий, массивы спектра и напряженности магнитного поля.

6. *Вычитание и сложение*

6.1. ВВОД ПЕРВОГО ОПЕРАНДА. ВВЕДИТЕ НАЗВАНИЕ ФАЙЛА В ВИДЕ НННFFF (см. п.5.2).

6.2. ВВОД ВТОРОГО ОПЕРАНДА. ВВЕДИТЕ НАЗВАНИЕ ФАЙЛА В ВИДЕ НННFFF (то же, что и в 6.1).

6.3. ВЫБОР ЗОНЫ СРАВНЕНИЯ НА ГРАФИЧЕСКОМ ДИСПЛЕЕ (выход — «RETURN»). На экране графического дисплея разными цветами выводятся участки по 256 точек обоих спектров. Зоны вывода автоматически меняются. При появлении зоны, удобной для сравнения спектров, нажать клавишу «RETURN».

6.4. ВВЕДИТЕ ПОПРАВКУ НА СМЕЩЕНИЕ ВЫЧИТАЕМОГО. Ввести цифру со знаком, определяющим направление смещения (минус — влево). Для остановки автоматического смещения нажать клавишу «RETURN», после чего вновь высвечивается вопрос 6.4. Для дальнейшего смещения ввести число. Если же смещение достаточно, нажать клавишу «RETURN».

6.5. РЕЖИМ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАБОТЫ: 1 — СЛОЖЕНИЕ, 2 — ВЫЧИТАНИЕ. Ввести цифру, соответствующую необходимому режиму. В случае введения 0 происходит выход из программы в меню.

6.6. ВВЕДИТЕ ПРОЦЕНТ N%N%. Ввести число (дробное), соответствующее проценту второго операнда, над которым необходимо провести выбранную операцию, например 124.1. При вводе 0 управление передается следующему запросу. Результат высвечивается на графическом дисплее и осциллографе радиоспектрометра, причем на последнем в масштабе относительно первого операнда. Для прекращения вывода на осциллограф нажать клавишу «RETURN».

6.7. РЕЗУЛЬТАТ ЗАПИСАТЬ НА ДИСК? ДА — ввести 1 и далее согласно п.5.3, в противном случае ввести 0. При этом происходит выход из программы в меню.

7. *Вывод спектров на принтер*

7.1. ВВЕДИТЕ НАЗВАНИЕ ФАЙЛА (см. п. 5.2).

7.2. Производится вывод спектра на принтер.

7.3. ВВЕДИТЕ СТРОКУ ТЕКСТА. Ввести комментарий из набора символов (в строке 50 символов, строк — 2). Если нет необходимости ввода комментария, просто нажать RETURN. Программа печатает шапку. Происходит выход из программы в меню.

#### 8. *Определение параметров*

8.1. ВВЕДИТЕ НАЗВАНИЕ ФАЙЛА (см. п. 5.2).

8.2. ПОПРАВКА РЕПЕРА (ДЛЯ МАСШТАБИРОВАНИЯ — ЛЮБОЙ СИМВОЛ). Ввести цифру, равную шагу автоматического передвижения вертикальной метки, со знаком, определяющим направление движения (минус — влево). Метка отображается на экране графдисплея, а значение амплитуды спектра и напряженности магнитного поля в данной точке выводится на дисплей.

Для выхода из программы вводится 0. Для прекращения движения метки нажать клавишу «RETURN», после чего высвечивается вопрос 8.2. В случае необходимости дальнейшей корректировки положения метки вводится число. Для перехода к масштабированию ввести любой символ, после чего на дисплее высвечивается:

8.3. 1 — СЖАТИЕ ПО X, 2 — РАСТЯЖКА ПО X, 3 — МАСШТАБИРОВАНИЕ ПО Y. При вводе 0 управление переходит к 8.2. При выборе указанных режимов происходит следующее.

8.3. 1. Спектр сжимается по X в два раза. На дисплее высвечивается диапазон развертки магнитного поля результата, сам спектр выводится на экран графдисплея. Управление передается в п.8.3.4.

8.3.2. ВЫБЕРИТЕ ЗОНУ РАСТЯЖКИ И НАЖМИТЕ «RETURN». На экране графдисплея изображаются спектр и две вертикальные линии (метки), выделяющие зону спектра, предназначенную для растяжки по X. Положение меток меняется автоматически, пока оператор не нажмет «RETURN». Участок спектра, ограниченный метками, растягивается в два раза. Управление передается в п. 8.3.4.

8.3.3. ВВЕДИТЕ ПОПРАВКУ ГРАНИЦ МАСШТАБИРОВАНИЯ; ДЛЯ ПЕРЕХОДА К МАСШТАБИРОВАНИЮ — ЛЮБОЙ СИМВОЛ; ЛЕВ., ПРАВ. Вводятся два целых числа, разведенные запятой, обозначающие шаги циклического изменения положения левой и правой метки, которые ограничивают зону масштабирования по Y. Числа вводятся со знаком, определяющим направление перемещения метки (минус — влево). Для остановки перемещения нажать «RETURN», после чего высвечивается запрос 8.3.3. Для дальнейшей корректировки ввести числа. При вводе 0 управление передается в п. 8.2. При вводе любой буквы происходит автоматическое пошаговое масштабирование по Y участка спектра между метками. Для остановки масштабирования нажать «RETURN», после чего управление передается на п.8.2.

8.3.4. СПЕКТР ЗАПИСАТЬ НА ДИСК? Если да, ввести 1 и далее, как в п.5.3; если нет, ввести 0, после чего происходит переход к п.8.3.

## 9. Сравнение спектров

9.1. ВВЕДИТЕ НАЗВАНИЕ ФАЙЛА (см. п. 5.2);

9.2. ВВОД ВТОРОГО СПЕКТРА: ВВЕДИТЕ НАЗВАНИЕ ФАЙЛА (см. п. 5.2).

9.3. Выводятся оба спектра разными цветами на экран графдисплея.

9.4. ВВЕДИТЕ ПОПРАВКУ НА СМЕЩЕНИЕ  $X, Y =$ . Вводят два целых числа, означающих соответственно сдвиг по  $X$  и  $Y$ , со знаками, определяющими направление сдвига (минус — соответственно влево по  $X$  и вниз по  $Y$ ). Производится автоматическое смещение второго спектра относительно первого с указанием шагов по  $X$  и  $Y$  в цикле. При каждом смещении вычисляется среднеквадратичная ошибка и выводится на дисплей. Для остановки смещения нажать «RETURN», после чего вновь высвечивается запрос 9.4. При вводе 0 происходит выход из программы в меню. Для дальнейшего смещения спектров вводятся новые значения шагов.

## § 6. Анализ информации в автоматизированных системах биофизического эксперимента

Обработку биофизической информации, регистрируемой на экспериментальных установках различного класса, осуществляют поэтапно. Вне зависимости от конкретных исследований выделяют три основных этапа.

*На первом этапе* осуществляются управление установкой и снятие информации непосредственно с регистрирующей аппаратуры (или с промежуточных носителей информации), перевод ее в числовой код и запись в память ЭВМ. Как правило, в биофизических исследованиях информация регистрируется на диаграммной ленте, фотобумаге, фото- и киноплёнке, а также перфоленте (у аппаратуры с цифровым выходом).

*На втором этапе* производится первичная обработка, представляющая собой широкий набор достаточно простых, но необходимых исследователю математических операций с экспериментальными данными. Она может включать в себя нормировку данных, статистическую обработку с оценкой степени доверия, дифференцирование и интегрирование, различные нелинейные преобразования, цифровую фильтрацию и т. д. На этом этапе важное значение имеет документирование данных в удобной для экспериментатора форме и их архивизация.

*Третий этап* представляет собой интерпретацию результатов, полученных на втором этапе обработки. Она состоит обычно в оценке искомым характеристик математической модели изучаемого явления или объекта.

Программное обеспечение всего комплекса обработки (от первого до третьего этапа) обычно называют *системой полной математической обработки результатов*. Система обработки может рабо-



тать как в режиме диалога с исследователем, так и автоматически, без вмешательства человека на промежуточных стадиях.

Как правило, в экспериментальных биофизических исследованиях регистрируются не интересующие исследователя характеристики явления  $Z$ , а лишь их некоторые проявления  $u$ , связанные с  $Z$  некоторой зависимостью  $A$ :

$$u = AZ \quad (\text{IX.6.1})$$

Конечной целью математической обработки экспериментальных данных является решение этого уравнения относительно  $Z$ . В отличие от методов классической математики, оперирующей с точными исходными данными и точно выполненными вычислениями, специфика обработки экспериментальной информации связана с принципиальной особенностью — *приближенным заданием* измерительной информации. Это обстоятельство обусловило развитие нового направления прикладной математики, связанного с решением так называемых *некорректно поставленных задач*. Ведущая роль в развитии этого направления принадлежит школе академика А. Н. Тихонова.

Существенной особенностью некорректно поставленных задач является неустойчивость к малым изменениям исходных данных, т. е. сколь угодно малые изменения исходных данных могут приводить к произвольно большим изменениям решений. Один из классов некорректно поставленных задач составляют интегральные уравнения первого рода. В частности, к этому классу относятся задачи математической обработки данных в исследованиях фотобиологических процессов методами спектроскопического анализа. Так, задачей изучения спектра абсорбции или люминесценции является определение интенсивности электромагнитного излучения как функции длины волны или энергии  $Z(s)$  (здесь  $s$  — длина волны или энергия). При пропускании этого излучения через регистрирующую аппаратуру (монокроматор, приемник излучения и т. п.) получают экспериментальный спектр  $u(x)$ . При этом  $x$  может быть в терминах длины волны (энергии) или единицах напряжения (силы тока). Если измерительная аппаратура линейна, то функциональная связь между  $Z(s)$  и  $u(x)$  задается формулой

$$u(x) = \int_{x_1}^{x_2} K(x, s) Z(s) ds \equiv AZ,$$

где  $K(x, s)$  — аппаратная функция прибора, которая предполагается известной. Она представляет собой экспериментальный спектр (как функция  $x$ ), получаемый при пропускании через данную аппаратуру монохроматического излучения частоты  $s$  единичной интенсивности. Величины  $x_1$  и  $x_2$  соответствуют границам спектра.

Аналогично этому, при изучении характера кинетики переходных процессов методами спектроскопии искомая зависимость  $Z(\tau)$  связана с регистрируемой в эксперименте  $u(t)$  соотношением

$$u(t) = \int_0^t K(t, \tau) Z(\tau) d\tau \equiv AZ,$$

где  $K(t, \tau)$  — аппаратная функция прибора, включающая влияние регистрирующей аппаратуры и воздействия возбуждающего переходной процесс;  $0, t$  — границы интервала регистрации.

Каковы общие аспекты проблемы, связанной с решением некорректно поставленных задач? Пусть ядро  $K(x, s)$  является непрерывной функцией по  $x$  и  $s$  в замкнутой области  $\{s_1 \leq s \leq s_2; x_1 \leq x \leq x_2\}$  и имеет непрерывные частные производные  $\partial K/\partial x$  и  $\partial K/\partial s$ . Пусть  $u(x)$  принадлежит пространству  $U$ , а  $Z(s)$  — пространству  $F$ . Уклонение функций из пространства  $F$  оценивают по формуле

$$\rho_U(u_1, u_2) = \left\{ \int_{x_1}^{x_2} [u_1(x) - u_2(x)]^2 dx \right\}^{1/2},$$

а уклонение решений  $Z(s)$  — по следующей формуле:

$$\rho_F(Z_1, Z_2) = \max |Z_1(s) - Z_2(s)|.$$

В силу того что регистрация экспериментальной информации производится с ошибкой, повторение одного и того же опыта приводит к разным функциям  $u_1(x), u_2(x), \dots$ , т. е. известны лишь приближительные значения  $\tilde{u}(x)$  левой части уравнения (IX.6.1) и число  $\delta > 0$ , так что уклонение  $\rho_U(u_T, \tilde{u}) \leq \delta$  ( $u_T$  — точное значение  $u(x)$ ). В этом случае естественно брать в качестве возможных приближенных решений функции  $Z(s)$  пространства  $F$ , для которых  $\rho_U(AZ, \tilde{u}) \leq \delta$ .

Однако функций, удовлетворяющих этому условию, может быть много, и среди них есть такие, которые в метрике пространства решений могут как угодно сильно уклоняться друг от друга.

В связи с этим производят доопределение понятия «приближенное решение», под которым понимается такой элемент  $\tilde{Z}$  из пространства  $F$ , который бы стремился к точному решению  $Z_T$  в пространстве  $F$  при  $\delta \rightarrow 0$ .

Для определения приближенных решений некорректно поставленных задач, устойчивых к малым изменениям исходных данных, разработаны различные методы. Среди них широкое распространение получили методы подбора, квазирешения, замены исходного уравнения в определенном смысле близким ему, квазиобращения.

Другим подходом к решению некорректно поставленных задач является широко распространенный на практике *метод регуляризации*. В связи с тем что величина  $\delta$  характеризует погрешность,

представляется естественным определить приближенное решение  $\tilde{Z}$  с помощью оператора (обозначим его  $R$ ), зависящего от некоторого параметра  $\alpha$ , значение которого надо брать согласованным с  $\delta$ . Очевидно, что согласованность должна заключаться в том, чтобы при  $\delta \rightarrow 0$  приближенное решение  $\tilde{Z}$  стремилось к точному решению  $Z_\tau$ .

Оператор  $R(u, \alpha)$ , зависящий от параметра  $\alpha$  и действующий из пространства исходных данных  $u$  в пространство искомым решений  $F$ , называется *регуляризирующим* для уравнения  $AZ = u$  (относительно  $u_\tau$ ), если он обладает следующими свойствами.

1. Существуют такие числа  $\delta_1 > 0$ ,  $\alpha_1 > 0$ , что оператор  $R(u, \alpha)$  определен для всякого  $\alpha$ , принадлежащего промежутку  $(0, \alpha_1)$ , и любого  $u$ , принадлежащего  $U$ , для которого  $\rho_U(u, u_\tau) \leq \delta_1$ .

2. Существует такой функционал  $\alpha = \alpha(u, \delta)$ , определенный на множестве  $U = \{u, \rho(u, u_\tau) \leq \delta_1\}$  элементов  $u$ , что для любого  $\epsilon > 0$  найдется число  $\delta(\epsilon) \leq \delta_1$  такое, что если  $\tilde{u}$  принадлежит  $U$  и  $\rho_U(\tilde{u}, u_\tau) \leq \delta \leq \delta(\epsilon)$ , то  $\rho_F(Z_\tau, Z_\alpha) \leq \epsilon$ , где  $Z_\tau = R(\tilde{u}, \alpha(\tilde{u}, \delta))$ .

Таким образом, построение приближенного решения методом регуляризации сводится к нахождению регуляризирующего оператора и к определению параметра регуляризации  $\alpha$  по дополнительной информации о задаче (например, по величине погрешности, с которой задается  $u$ ).

В каждом конкретном случае нахождение вида оператора и определение оптимального значения параметра регуляризации является самостоятельной, а иногда достаточно сложной задачей.

Рассмотрим выбор регуляризирующего оператора на примере решения уравнений типа свертки:

$$u(t) = \int_{-\infty}^{\infty} K(t-\tau) Z(\tau) d\tau. \quad (\text{IX.6.2})$$

Если левая часть уравнения (IX.6.2) известна приближенно, т. е.  $u(t) = u_\tau(t) + v(t)$ , где  $v(t)$  — шумовое воздействие, то, используя преобразование Фурье, получаем

$$Z(\omega) = u(\omega)/K(\omega) = u_\tau(\omega)/K(\omega) + v(\omega)/K(\omega).$$

Так как  $u_\tau(\omega) = K(\omega) + Z_\tau(\omega)$ , то

$$Z(\omega) = Z_\tau(\omega) + (v(\omega)/K(\omega)).$$

Эта формула дает преобразование Фурье точного решения (IX.6.2) с приближенной правой частью. Казалось бы, естественно в качестве приближенного решения (IX.6.2) с приближенной левой ча-

стью взять функцию, полученную с помощью обратного преобразования Фурье, т. е.

$$Z(t) = (1/2\pi) \int_{-\infty}^{\infty} Z(\omega) e^{-i\omega t} d\omega = (1/2\pi) \int_{-\infty}^{\infty} Z_T(\omega) e^{-i\omega t} d\omega + \\ + (1/2\pi) \int_{-\infty}^{\infty} \frac{v(\omega)}{K(\omega)} e^{-i\omega t} d\omega = Z_T(t) + (1/2\pi) \int_{-\infty}^{\infty} \frac{v(\omega)}{K(\omega)} e^{-i\omega t} d\omega.$$

Однако такая функция может не существовать, так как последний интеграл может быть расходящимся. Если же такая функция существует, то не обладает свойствами устойчивости к малым отклонениям левой части  $u(t)$ . Причиной неустойчивости такого алгоритма является влияние высоких частот  $v(\omega)$  преобразования Фурье помехи  $v(t)$ . Для построение приближенного решения (IX.6.2) необходимо подавить влияние высоких частот  $\omega$ , умножая, например, функцию  $u(\omega)/K(\omega)$  на соответствующий множитель  $f(\omega, \alpha)$ , зависящий от  $\alpha$ .

Пусть функция  $f(\omega, \alpha)$  удовлетворяет следующим условиям:

1.  $f(\omega, \alpha)$  определена в области  $(\alpha \geq 0, -\infty < \omega < +\infty)$ .
2.  $0 \leq f(\omega, \alpha) \leq 1$  для всех значений  $\alpha \geq 0$  и  $-\infty < \omega < +\infty$ .
3.  $f(\omega, 0) = 1$ .
4. Для всякого  $\alpha > 0$   $f(\omega, \alpha)$  — четная по  $\omega$  и  $f(\omega, \alpha)$  принадлежит пространству  $L_2$ .
5. Для всякого  $\alpha > 0$   $f(\omega, \alpha) \rightarrow 0$  при  $\omega \rightarrow \pm\infty$ .
6. При  $\alpha \rightarrow 0$   $f(\omega, \alpha) \rightarrow 1$ , не убывая, причем на всяком отрезке  $|\omega| \leq \omega_1$  эта сходимость равномерная.
7. Для всякого  $\alpha > 0$   $f(\omega, \alpha)/K(\omega) \in L_2(-\infty, \infty)$ .
8. Для всякого  $\omega \neq 0$   $f(\omega, \alpha) \rightarrow 0$  при  $\alpha \rightarrow \infty$  и эта сходимость равномерная на всяком отрезке  $[\omega_1, \omega_2], 0 < \omega_1 < \omega_2$ .

В этих условиях под пространством  $L_2(-\infty; \infty)$  подразумевается пространство функций  $Z(x)$ , интегрируемых с квадратом:

$$\|Z\| = \left\{ \int_{-\infty}^{\infty} Z^2(x) dx \right\}^{1/2}.$$

Если функция  $f(\omega, \alpha)$  удовлетворяет приведенным выше условиям (1—8), то в соответствии с теоремой Тихонова, определенный с ее помощью оператор  $R(u, \alpha)$  является регуляризующим оператором для уравнения (IX.6.2), где

$$R(u, \alpha) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} \frac{f(\omega, \alpha)}{K(\omega)} u(\omega) e^{-i\omega t} d\omega.$$

Функцию  $f(\omega, \alpha)$  называют *стабилизирующим множителем*. Выбор оптимальной функции  $f(\omega, \alpha)$  зависит от особенностей конкретной задачи и во многих случаях осуществляется с помощью численного эксперимента. Примеры стабилизирующих множителей:

$$f_1(\omega, \alpha) = e^{-\alpha^2 \omega^2}; f_2(\omega, \alpha) = \frac{K^2(\omega)}{K^2(\omega) + \alpha\omega^2}.$$

Не останавливаясь на других возможных подходах к решению поставленной задачи, необходимо отметить, что в последнее время в связи с бурным развитием цифровой техники появилось большое количество работ, посвященных выделению «идеального» спектра из зарегистрированного на реальном приборе. В частности, предложен метод, с помощью которого может быть получена принципиально важная спектроскопическая информация без перехода к идеальному спектру, что отвечает увеличению разрешения не бесконечно, а только в несколько раз, что равносильно записи спектра на приборе более высокого класса. Такая необходимость возникает зачастую при работе на стандартных приборах, когда световые потери из-за малых размеров образца, потери на окнах криостата, поляризаторе и т. п. вынуждают проводить измерения при больших щелях, что заведомо не дает возможности использовать разрешение прибора.

### Анализ кинетической информации

Одним из распространенных биофизических подходов при изучении пространственно-временной организации и молекулярных механизмов первичных процессов фотосинтеза является *кинетический метод*. В основу экспериментальных исследований положена регистрация процесса релаксации изучаемой системы к равновесному состоянию после выведения ее из этого состояния каким-либо внешним воздействием. В фотобиологических исследованиях в качестве внешнего воздействия, как правило, используют возбуждающий свет, хотя в общем случае это могут быть скачок температуры, давления, импульсы электрического или магнитного поля. В процессе кинетических исследований следят за изменениями структурно-конформационных состояний молекул и надмолекулярных структур либо используют эти изменения в качестве индикаторов для реакций, интересующих исследователя.

Изучение кинетик поведения сложных биологических систем базируется на построении и анализе математических моделей, в которых скорость изменения концентрации различных составных компонентов выражена через скорость отдельных элементарных реакций, принимающих участие в их образовании или исчезновении. В процессе построения модели проводят уточнение характера связей между взаимодействующими компонентами, а также значений параметров, которые на первых этапах могут носить весьма ориентировочный характер. Последующая проверка справедливости моде-

ли состоит в таком варьировании значений параметров, которое максимально приблизило бы поведение модели к оригиналу.

Модельное описание системы, состоящей из различных взаимодействующих компонентов, в общем виде сводится к составлению и анализу системы из  $N$  дифференциальных уравнений первого порядка:

$$\begin{aligned} dc_1/dt &= f_1(c_1, c_2, \dots, c_N, k_1, k_2, \dots, k_M); \\ dc_N/dt &= f_N(c_1, c_2, \dots, c_N, k_1, k_2, \dots, k_M). \end{aligned} \quad (\text{IX.6.3})$$

При этом предполагают, что каждое  $i$ -е соединение из общего их числа характеризуется значением концентрации  $c_i$  ( $i = 1, 2, \dots, N$ ), которое изменяется во времени  $c_i = c_i(t)$  в результате взаимодействия  $i$ -го соединения с любым из остальных. Константы скорости этих взаимодействий обозначены  $k_1, \dots, k_M$ .

Правые части уравнений (IX.6.3) в зависимости от характера протекающих в системе процессов могут содержать как линейные, так и нелинейные члены относительно переменных  $c_1(t), \dots, c_N(t)$ , а также члены, явно зависящие от времени. В этом случае аналитический анализ системы (IX.6.3) затруднен и решение производится численными методами с использованием быстродействующих ЭВМ.

Отождествление полученных результатов с экспериментальными данными затруднено из-за наличия нескольких наборов коэффициентов, удовлетворяющих экспериментальным данным с заданной степенью точности. Для преодоления этих трудностей, как правило, максимально упрощают математическое описание системы и поиск решения. С этой целью экспериментально создаются условия, в которых модель поведения системы имеет линейный характер. Например, создается избыток одного из компонентов, концентрация которого изменяется во времени и может входить в дифференциальные уравнения в виде константы. При этом скорости биомолекулярных реакций с участием этого компонента становятся зависимыми лишь от одного переменного и система уравнений (IX.6.3) становится линейной. Решение системы дифференциальных уравнений сводится к линейной комбинации экспоненциальных функций вида  $A_i e^{-\lambda_i t}$  ( $i = 1, \dots, M$ ), где  $A_i$  соответствует локальным концентрациям реагентов, а  $\lambda_i$  характеризует скорости протекающих реакций.

Таким образом, при исследовании кинетики переходных процессов в биофизических исследованиях встает задача разложения экспериментально зарегистрированной кривой, представимой в виде

$$f(t) = \sum_{i=1}^M A_i e^{-\lambda_i t} + c + \xi(t),$$

на отдельные компоненты и определения по форме кривой неизвестных коэффициентов  $A_i$  и  $\lambda_i$ . В общем случае количество компонентов  $M$  также неизвестно и подлежит определению. Задача ос-

ложняется наличием характерных для экспериментальных сигналов особенностей: неизвестной постоянной составляющей  $C$  и паразитной шумовой помехи  $\xi(t)$ .

Следует подчеркнуть, что поставленная задача неустойчива к малым возмущениям исходных данных, т. е. является некорректно поставленной задачей. Для примера рассмотрим на интервале  $[0, 2]$  две таблично заданные функции:

$$f_i = e^{-t_i} + e^{-5t_i} + e^{-9t_i};$$

$$g_i = 1,07872e^{-1,05321t_i} + 1,92052e^{-6,97719t_i},$$

где  $t_i = Hx_i$ ;  $H = 0,004$ ;  $i = 0,1, \dots, 499$ .

Расчет на ЭВМ среднеквадратичного отклонения функции, состоящей из трех компонентов, от функции  $g_i$ , состоящей из двух компонентов, дал следующий результат:

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^{499} (g_i - f_i)^2} = 0,0041,$$

что составляет менее 0,15 % от суммарной амплитуды сигнала. При сопоставлении графиков этих функций такое отклонение визуально не различимо.

Все известные методы разложения с использованием ЭВМ можно разделить на три группы. К *первой группе* относятся методы, аналогичные методам ручной обработки, реализованные на ЭВМ. Их идея основана на анализе кривой переходного процесса при ее изображении в полулогарифмическом масштабе. При этом одноэкспоненциальная кривая представляет собой прямую линию. Если кривая состоит из суммы экспонент, то по хвосту этой кривой (в части, где влияние быстрых компонентов максимально) определяют параметры наиболее долгоживущей составляющей, затем вычитают ее из суммарной кривой и процедуру повторяют с оставшейся частью. Недостатки этого метода как при ручной, так и при машинной обработке заключаются в низкой точности и плохом разрешении компонентов. При наличии в исследуемом сигнале нескольких экспонент с близкими параметрами этот подход может привести к полному искажению результатов.

Методы *второй группы* основываются на различных интегральных преобразованиях, таких, как преобразования Фурье, Лапласа, вычисление моментов. Общей особенностью методов является то, что на одном из этапов вычислений проводят интегрирование от нуля до бесконечности. Цель этой операции — сведение задачи разложения экспоненциальной функции к более простым задачам. Но именно использование интегрирования приводит к одному из основных недостатков метода — к увеличению ошибок вследствие ограниченности реальных сигналов. В итоге становится принципиально невозможным определить отдельные компоненты при выборе ограниченного

участка суммарной кривой. Общим недостатком второй группы методов является плохая устойчивость к шумовым помехам.

В частности, в методах, основанных на преобразовании Фурье (например, в методе Гарднера и аналогичных ему), информация об отдельных компонентах заключена в кривой, представляющей собой в идеальном случае сумму  $\delta$ -функций, высота которых пропорциональна отношению  $A_i/\lambda_i$ , а положение —  $\ln \lambda_i$ . Вследствие ограниченности точности задания суммарной кривой в области интегрирования происходит уширение максимумов, соответствующих отдельным компонентам, а также появляются паразитные осцилляции между максимумами. К недостаткам также относится необходимость ввода данных в ЭВМ в полулогарифмическом масштабе.

К *третьей группе* относятся наиболее эффективные и развиваемые в настоящее время методы, которые условно можно назвать *алгебраическими*. В основе их лежит решение линейных алгебраических уравнений специальными регуляризационными методами.

Известны попытки решения задачи декомпозиции непосредственно с помощью *метода наименьших квадратов*. Для случая двух компонентов невязка ( $S$ ) имеет вид

$$S = \sum_{i=1}^N (f_i - A_1 e^{\lambda_1 t_i} - A_2 e^{\lambda_2 t_i})^2.$$

Минимум этой величины находят из условия равенства нулю производных невязки по соответствующим параметрам. Прямое решение получаемых уравнений сопряжено со значительными трудностями вычислительного характера и требует применения самых современных быстродействующих ЭВМ.

Ниже описан один из методов анализа кинетической информации, программная реализация которого включена в состав пакетов прикладных программ автоматизированных комплексов на основе микроЭВМ «Электроника-60», а также ЭВМ СМ-4. В процессе анализа определяются показатели экспонент, амплитуды, среднеквадратичная ошибка.

Для простоты рассмотрим сущность метода на примере, когда переходный процесс может быть представлен суммой двух экспонент:

$$f(t) = A_1 e^{\lambda_1 t} + A_2 e^{\lambda_2 t},$$

где показатели  $\lambda_1$  и  $\lambda_2$  действительны и различны. Целью анализа является определение значений параметров  $\lambda_1$ ,  $\lambda_2$ ,  $A_1$ ,  $A_2$ , когда значения функции  $f(t)$  заданы таблично на равномерной дискретной сетке аргумента  $t$ .

Легко проверить прямой подстановкой, что функция  $f(t)$  удовлетворяет дифференциальному уравнению

$$[(d/dt) - \lambda_1][(d/dt) - \lambda_2]f(t) = 0. \quad (\text{IX.6.4})$$



Первый этап анализа состоит в определении значений параметров  $\lambda_1$  и  $\lambda_2$ , когда решение (IX. 6.4) известно и задано таблично.

Решая (IX.6.4) относительно  $[(d/dt) - \lambda_2] f(t)$  и производя интегрирование, получаем

$$f(t) - f(t_0) = \frac{-B_1 e^{\lambda_1 t}}{\lambda_1} \Big|_{t_0}^t + \int_{t_0}^t f(t) dt, \quad (\text{IX.6.5})$$

где  $t_0$  — начальное значение аргумента,  $B_1$  — константа, определяемая параметрам  $A_1, \lambda_1, \lambda_2$ .

Выбирая достаточно произвольную область интегрирования и интегрируя (IX. 6.5) от  $t_0$  до некоторого значения  $t_i$  из области задания  $t$ , получаем при  $i = 1, \dots, N$  набор линейно независимых уравнений (IX. 6.6), которые для удобства запишем в виде

$$\begin{aligned} B_1 \delta e^{\lambda_1 t_i} + \lambda_2 I_i - \delta f_i &= 0; \\ \delta e^{\lambda_1 t_i} &= (e^{\lambda_1 t_i} - e^{\lambda_1 t_0}) / \lambda_1, \end{aligned} \quad (\text{IX.6.6})$$

где

$$I_i = \int_{t_0}^t f(t) dt; \quad \delta f_i = f(t_i) - f(t_0).$$

Аналогичными рассуждениями можно получить еще один набор линейно независимых уравнений в виде

$$B_2 \delta e^{\lambda_2 t_i} + \lambda_1 I_i - \delta f_i = 0, \quad (\text{IX.6.7})$$

где  $\delta e^{\lambda_2 t_i} = (e^{\lambda_2 t_i} - e^{\lambda_2 t_0}) / \lambda_0$ .

Аналогично предыдущему случаю  $B_2$  определяется параметрами  $A_1, \lambda_1, \lambda_2$ . При наличии в анализируемом сигнале шумовой помехи система трансцендентных уравнений (IX. 6.6), (IX. 6.7) может быть несовместна. В связи с этим получение приближенного решения набора уравнений производят методом наименьших квадратов. Минимизируя стандартным образом длину вектора невязок, можно получить уравнения относительно параметров  $\lambda_1$  и  $\lambda_2$ , но прямое их решение будет затруднительно. В связи с этим строится итерационная процедура, в соответствии с которой последующие приближения параметров  $\lambda_1^{(n+1)}$  и  $\lambda_2^{(n+1)}$  определяются через предыдущие  $\lambda_1^{(n)}$  и  $\lambda_2^{(n)}$ . Окончательная расчетная формула для  $\lambda_2^{(n+1)}$  имеет вид

$$\lambda_2^{(n+1)} = \frac{\sum_i (\delta e^{\lambda_1^{(n)} t_i})^2 \sum_i \delta f_i I_i - \left( \sum_i \delta e^{\lambda_1^{(n)} t_i} I_i \right) \left( \sum_i \delta f_i \delta e^{\lambda_1^{(n)} t_i} \right)}{\sum_i (\delta e^{\lambda_1^{(n)} t_i})^2 \sum_i I_i^2 - \left( \sum_i \delta e^{\lambda_1^{(n)} t_i} I_i \right)^2}.$$

Вычисление  $\lambda_1^{(n+1)}$  производят также по этой формуле после замены  $\lambda_1^{(n)}$  на  $\lambda_2^{(n+1)}$ .

Начальное приближение в итерационном процессе задается по формуле

$$\lambda_1^{(0)} = (f(t_N) - f(t_0)) / \int_{t_0}^{t_N} f(t) dt.$$

В случае сходимости итерационной процедуры за искомые  $\lambda_1$  и  $\lambda_2$  принимаются значения  $\lambda_1^{(\infty)}$  и  $\lambda_2^{(\infty)}$  пределов последовательностей  $\lambda_1^{(n)}$  и  $\lambda_2^{(n)}$ . Значения амплитуд  $A_1$  и  $A_2$  рассчитывают методом наименьших квадратов по вычисленным значениям параметров  $\lambda_1$  и  $\lambda_2$ . Для улучшения сходимости итерационного процесса в расчетные формулы вводят инкремент по формуле

$$\lambda_i^{(n)} = \lambda_i^{(n-1)} + 0,75(\lambda_i^{(n)} - \lambda_i^{(n-1)}).$$

При использовании описанной методики для анализа экспериментальных данных проводят предварительную обработку, представляющую собой анализ и устранение «выпавших точек», обусловленных случайными ошибками. Точка считается «выпавшей», если она отличается от двух соседних более чем на 20 %. Осуществляется предварительное сглаживание данных с помощью кубической параболы  $y = a + bx + cx^2 + dx^3$ . Каждый внутренний член массива данных объединяется с тремя справа от него и тремя слева. Через семь последовательно расположенных точек методом наименьших квадратов проводят параболу и значение средней точки заменяют значением параболы в этой точке. Сглаживание трех первых и последних точек проводят аналогично, но парабола строится несимметрично относительно них.

### Компьютерный анализ спектров ЭПР спин-меченых белков

В основе метода лежат избирательное введение в биологический объект стабильного иминоксильного радикала (спиновой метки) и анализ спектров ЭПР этого радикала при различных условиях окружающей среды. Спектры ЭПР спиновых меток чувствительны к вращательной подвижности и ориентации радикалов, на их форму влияют броуновское вращение, внутренняя конформационная подвижность и локальная структура белковой макромолекулы.

В соответствии с теорией основным фактором, определяющим форму спектра ЭПР данного нитроксильного радикала является распределение его неспаренного электрона по (N—O)-фрагменту молекулы. Спин-гамильтониан для трехсантиметрового диапазона СВЧ-поля малой мощности при условии низкой локальной концентрации парамагнитных центров и медленного прохождения через резонансные условия имеет следующий вид:

$$H = \beta S G H + \gamma \hbar S A I,$$

где  $H$  — величина магнитного поля;  $S$  — оператор спина электрона;  $I$  — оператор спина ядра азота  $^{14}\text{N}$ ;  $A$  и  $G$  — тензоры сверхтонкой структуры (СТС) и  $g$ -фактора с главными значениями  $A_x, A_y, A_z$  и  $g_x, g_y, g_z$  соответственно;  $\beta$  — магнетон Бора,  $\hbar$  — постоянная Планка,  $\gamma$  — гиромангнитное отношение. Первый член описывает энергию магнитного взаимодействия свободного электрона ( $\text{N} - \text{O}$ )-фрагмента нитроксильного радикала с внешним магнитным полем. Второй член соответствует взаимодействию электрона с ядром азота ( $\text{N} - \text{O}$ )-фрагмента радикала. Вследствие того что спин ядра  $^{14}\text{N}$  равен единице, СТС спектра представляет собой три линии равной интенсивности, расстояния между которыми равны и зависят от ориентации ( $\text{N} - \text{O}$ )-группы относительно внешнего магнитного поля. Рассмотрим (рис. 149, А) введенную для удобства анализа систему координат, ось  $x$  которой совпадает с направлением ( $\text{N} - \text{O}$ )-связи, а ось  $z$  — с направлением  $2p$   $\pi$ -орбитали атома азота. Углы  $\varphi$  и  $\theta$  определяют направление внешнего поля  $H$ . Эта система координат практически совпадает с собственной системой координат нитроксильного радикала, в которой  $A$ - и  $G$ -тензоры диагональны и характеризуются тремя собственными значениями:  $A_x, A_y, A_z$  и  $g_x, g_y, g_z$ .

В случае магниторазбавленного монокристалла того или иного нитроксила спектры ЭПР представляют собой триплеты одинаковой интенсивности. При этом если ось  $x, y$  или  $z$  направлена вдоль магнитного поля  $H$ , то расстояние между крайними пиками триплетта будет соответственно  $2A_x, 2A_y, 2A_z$ . Для спектров нитроксильных радикалов в водном растворе усредненное расстояние между крайними пиками СТС определяется

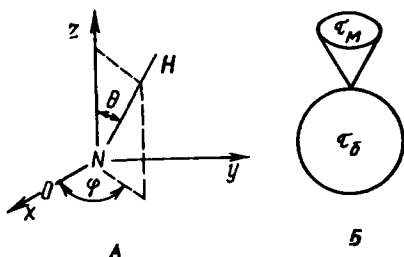


Рис. 149. Схема  $\text{N}-\text{O}$ -фрагмента нитроксильного радикала (А) и модель быстрого анизотропного ротатора на медленном изотропном ротаторе (Б)

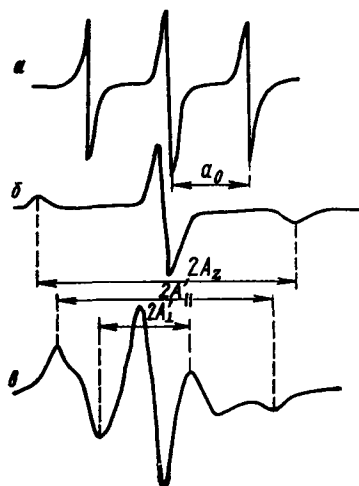


Рис. 150. Спектры ЭПР спин-метки: а — в водном растворе, б — в порошковом состоянии, в — ковалентно связанной с белковой молекулой в нормальных условиях ( $20^\circ\text{C}$ , раствор сахарозы, остальные объяснения см. в тексте)

как  $2a_0$  (рис. 150), где  $a_0 = (1/3)(A_x + A_y + A_z)$ . Для «порошковых» спектров расстояние между крайними широкими пиками (КШП) остается равным  $2A_z$ , в то время как центральная часть спектра есть результат суперпозиции вкладов от составляющих  $x$  и  $y$ , которые спектрально не разрешаются. Ввиду близости значений  $g_x$ ,  $g_y$  и  $g_z$  положения центров спектров с  $x$ -,  $y$ - или  $z$ -ориентацией мало отличаются и в трехсантиметровом диапазоне СВЧ влияют только на центральную часть спектра. В связи с этим весь анализ спектров ЭПР нитроксильных радикалов для статического или динамического вариантов ведется через изменение компонента СТС спектра (в соответствии с принятыми обозначениями  $2A_z$ ).

Как показывает эксперимент, при использовании нитроксильных радикалов для исследования динамики поведения макромолекул спектры ЭПР хорошо описываются моделью анизотропного ротатора на изотропном ротаторе (рис. 148, Б). Принципиальную роль для развития методики, описанной далее, играет то обстоятельство, что влияние на спектр ЭПР быстрых вращений радикала относительно белковой молекулы и медленных вращений комплекса белок — метка удается разделить на две аддитивные составляющие. Быстрое анизотропное вращение радикала с ( $\tau_6 \leq 10^{-9}$  с) приводит к тому, что компоненты СТС частично усредняются:  $A_x \rightarrow \bar{A}_x$ ;  $A_y \rightarrow \bar{A}_y$ ;  $A_z \rightarrow \bar{A}_z$ .

Медленное диффузное движение макромолекулы ( $\tau_m \geq 10^{-8}$  с) приводит к дополнительному сдвигу расстояния между КШП к центру спектра:

$$\begin{aligned} 2\bar{A}_z &\rightarrow 2\bar{A}'_z; \\ \Delta A_z &= (2A_z - 2\bar{A}_z) + (2\bar{A}_z - 2\bar{A}'_z), \end{aligned}$$

где первая составляющая соответствует изменению расстояния между КШП, обусловленному движением спин-метки относительно белка, а вторая определяется изотропным движением белковой молекулы. Учитывая природу ковалентного связывания нитроксильного радикала с белком, рассматривают аксиально-симметричный случай, при котором  $z$ -компонент СТС спектра ЭПР соответствует  $A_{\parallel}$ , а неразрешаемые  $x$ - и  $y$ -компоненты соответствуют  $A_{\perp}$  (соответственно вводят обозначения  $A_z = A_{\parallel}$ ,  $\bar{A}_z = \bar{A}_{\parallel}$ ,  $\bar{A}'_z = \bar{A}'_{\parallel}$ ). Количественно движение метки относительно белка характеризуется параметром порядка

$$S = (\bar{A}_{\parallel} - a_0) / (A_{\parallel} - a_0). \quad (\text{IX.6.8})$$

Таким образом, в спектре ЭПР нитроксильного радикала, присоединенного к белковой молекуле, содержится информация о средней амплитуде переориентации и средних частотах, определяющих спектр ЭПР. К настоящему времени прямая задача ЭПР-спектроскопии нитроксильных радикалов — моделирование спектров ЭПР

для заданной модели движения нитроксила — решена, созданы соответствующие программы расчета на ЭВМ. Разработаны методические подходы, позволяющие получить из экспериментальных спектров параметры, необходимые для теоретических расчетов, а также информацию для выбора адекватной модели вращения радикала.

Процесс моделирования спектров начинается с ввода в диалоговом режиме входных параметров: констант СТС и значения  $g$ -фактора для используемого типа радикала, параметра порядка  $s$ , времени перориентации белка  $\tau_B$ , ширины линий спектра (подбирается варьированием), значения магнитного поля  $H$  и значения начальной и конечной точек спектра относительно  $H$ . Затем указывается, какой из параметров необходимо варьировать, и шаг его изменения. Рассчитанные спектры «сбрасываются» на диск и выводятся на экран цветного графического дисплея цветом, отличным от цвета предыдущего спектра. Это позволяет оперативно контролировать ход расчета и производить предварительное сравнение спектров.

В соответствии с принятой методикой основные динамические параметры системы, используемые при моделировании, получают из вязкостных зависимостей расстояния между КШП, снятых при постоянных температурах (рис. 151). По наклону кривых находят время вращательной корреляции макромолекулы  $\tau_B$ . Точка пересечения прямой с осью ординат дает величину  $2\bar{A}_{\parallel}$ , используя которую по формуле (IX. 6.8) определяют параметр порядка  $s$ .

В основу методического подхода к анализу структуры сложных белковых молекул в растворе с использованием спин-меток положено естественное предположение о том, что:

а) метки, присоединенные к различным участкам глобулы, должны описываться несколькими параметрами порядка  $s$ , зависящими от конкретного динамического окружения метки;

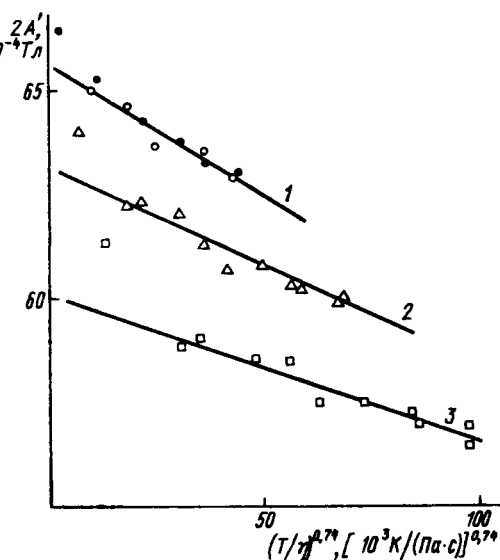


Рис. 151. Температурно-вязкостные зависимости расстояний между крайними широкими пиками ( $2A'$ ) в спектрах ЭПР:  
1 — температура 1°C, 2 — 20°C, 3 — 40°C

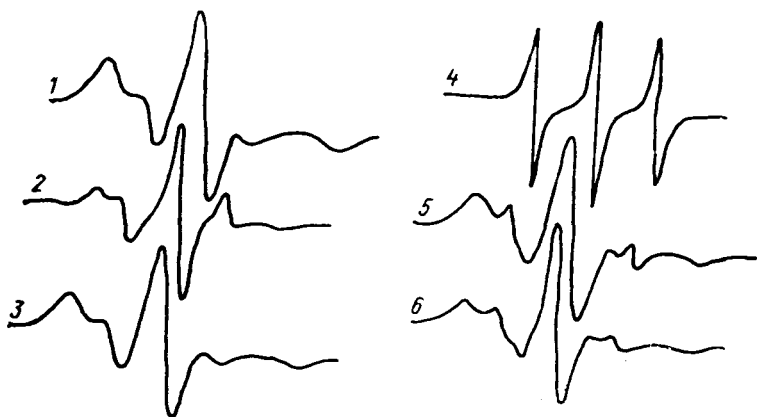


Рис. 152. Модельные и экспериментальные спектры ЭПР спин-меченого IgG в растворе без сахарозы при температуре 1°C:

1 — модельный спектр иммобилизованной метки вращения, 2 — модельный спектр более расторможенной метки, 3 — суперпозиция спектров 1 и 2, 4 — спектр свободной метки в растворе, 5 — суперпозиция модельных спектров 1, 2 и 4, 6 — экспериментальный спектр; значения входных параметров, использованные при моделировании спектров, указаны в тексте

б) если глобула состоит из нескольких частей, соединенных гибкими связями, то ее динамическое поведение будет описываться набором времен вращательной переориентации белка  $\tau_B$ ;

в) при изменении температуры или вязкости среды гибкая молекула должна претерпевать значительные конформационные изменения, вследствие чего должны изменяться параметры  $s$  и  $\tau_B$ .

Экспериментальный спектр, записанный с применением программ управления спектрометром, приведен на рис. 152, 6. При моделировании использовали следующие входные параметры  $A_x = 8$ ;  $A_y = 6$ ;  $A_z = 37,25$ ;  $g_x = 2,0093$ ;  $g_y = 2,0061$ ;  $g_z = 2,0022$ . Ширина линии  $3,75 \cdot 10^{-4}$  Тл. Параметры  $\tau_B = 43$  нс и  $s = 0,78$  определены из графиков, приведенных на рис. 151.

Спектр, полученный в результате моделирования, представлен на рис. 152, 1. Его сравнение с экспериментальным (рис. 152, 6) показывает, что последний отражает наличие дополнительного вклада от более расторможенной метки и от свободной метки в растворе. Определение значения  $s$  для более расторможенной метки производится с использованием тех же входных магнитных параметров и  $\tau_B$  при варьировании параметров  $s$  (один из спектров для  $s = 0,47$  приведен на рис. 152, 2). Варьированием весового вклада каждой из трех составляющих добиваются совпадения суммарного модельного спектра (5) с экспериментальным (6).

Весь процесс анализа происходит в режиме общения исследователя с системой посредством дисплея и соответствующего програм-

много обеспечения. В процессе обработки на экране графического дисплея одновременно изображаются разными цветами складываемые спектры, результат сложения и экспериментальный спектр. Такая графическая визуальность процесса обработки дает исследователю возможность оперативно корректировать значения весовых вкладов при сложении спектров, что значительно сокращает время работы. На экран дисплея выводится также среднеквадратичная ошибка отклонения модельного спектра от экспериментального. Возможность архивизации на магнитном диске экспериментальных данных и результатов обработки позволяет комплексно загружать экспериментальное оборудование и планировать различные этапы исследования.

## ПРИЛОЖЕНИЕ

### Метод мёссбауэровской фурье-спектроскопии в молекулярной динамике биополимеров

Экспериментальное изучение конформационной подвижности биополимеров и ее связи с функциональной активностью получает все большее развитие в советских и зарубежных научных центрах. Мёссбауэровская спектроскопия дает принципиальную возможность определить временную зависимость корреляционной функции Ван Хофа путем фурье-преобразования спектральной функции (см. VII.3.3). Эта проблема решается путем применения к уравнению (VII.3.3) методов, разработанных для решения некорректных задач (А. Н. Тихонов). Получаемая при этом зависимость среднего квадратичного смещения атомов от времени имеет статус экспериментальной, а метод ее определения по сути следует охарактеризовать как мёссбауэровскую фурье-спектроскопию (С. К. Басовец, И. В. Упоров, К. В. Шайтан). В рамках этого метода получаемый коррелятор  $\varphi(t)$  дает наглядное представление о динамике системы, не связанное с изначальным выбором какой-либо модели.

Непосредственно работая с экспериментальным спектром, получаем уравнение (VII.3.3) в виде:

$$N(\infty) - N(k) = \frac{c}{\pi} \int_0^{\infty} \varphi(t) e^{-\Gamma t/2} \cos \omega_k t dt, \quad (\text{Пр.1})$$

где  $k$  — номер канала,  $k \in [-k_b, k_b]$ ;  $\omega_k := k\Delta\omega$ ;  $\Delta\omega$  — расстояние по частотам между каналами;  $k_b$  — граничный номер канала;  $N(\infty)$  — значение фона;  $N(k)$  — набор в  $k$ -м канале;  $c$  — нормировочная константа. В идеальном случае тонкого поглотителя  $\Gamma = 2\Gamma_0$ . (Практически  $\Gamma$  определяют как ширину линий низкотемпературных спектров  $T < 150$  К.)

В соответствии с методами решения некорректных задач, первым шагом при определении  $\varphi(t)$  является нахождение *оператора регуляризации* (или физически оправданной процедуры), с помощью которого генерируются пробные функции  $\varphi(t)$ .



Пробные функции  $e^{-\Gamma t/2} \varphi(t)$  ищут в виде ряда с фиксированным набором  $\{P_i\}$ :

$$R(t) = \sum_{i=1}^N S_i \exp\left\{-\frac{P_i \Gamma t}{2}\right\}. \quad (\text{Пр.2})$$

Правомерность такой постановки задачи вытекает из теоремы Мюнца: если ряд  $\sum_i 1/n_i$  — расходится, то ряд  $\sum_i a_i x^{n_i}$  — сходится к любой наперед заданной функции из класса непрерывных функций при надлежащем выборе коэффициентов  $a_i$ . (В нашем случае  $x = \exp\{-\frac{1}{2} \Gamma t\}$ ). При подстановке (Пр.2) в (Пр.1) правая часть распадается на  $N$  лоренцевых линий, имеющих площади  $\{S_i\}$  и ширины  $\{P_i \Gamma\}$ . Набор  $\{S_i\}$  и величина  $N(\infty)$  далее легко находят с помощью методов линейной регрессии. В результате получаем алгоритм, позволяющий на базе экспериментальной функции  $N(k)$  найти близкое к  $e^{-\Gamma t/2} \varphi(t)$  приближение в виде ряда  $R(t)$ .

Ограниченность и дискретность области определения  $N(k)$ , а также погрешность в определении  $N(\infty)$  приводят к тому, что достоверная информация о поведении  $\varphi(t)$  может быть получена лишь в пределах временного отрезка  $[(\frac{1}{4} k_b \Delta \omega)^{-1}, (2 \Delta \omega)^{-1}]$ .

Оптимальный набор  $\{P_i\}$  определяют в два этапа. Сначала выбирают  $\{P_i\}$ , приводящие для  $g(k)$  к значению  $\chi^2$ , близкому единице ( $\chi^2 = \frac{1}{2k_b} \sum_{-k_b}^{k_b} [g(k) - (1 - \frac{N(k)}{N(\infty)})]^2 / g(k)$ ). (Условию  $\chi^2 = 1$  удовлетворяет истинная спектральная функция в силу того, что стандартное отклонение набора в канале равно корню квадратному из набора.)

Условия  $\chi^2 \approx 1$  достигают путем подбора соответствующего количества членов ряда (Пр.2). При этом учитывают, что добавление экспонент с  $P_i \Gamma > 2 k_b \Delta \omega$  практически не ведет к изменению  $\chi^2$ . Более того, исследование параметра  $R(0)$ , равного площади под модельным спектром, показало, что отклонение  $R(0)$  от  $\varphi(0)$  возрастает, если ряд  $\{P_i \Gamma\}$  выходит за пределы области, ограниченной сверху величиной  $2 k_b \Delta \omega$ .

Среди различных рядов  $\{P_i\}$ , приводящих к спектрам с  $\chi^2 \approx 1$ , оптимальный выбирается исходя из требований максимальной гладкости  $R(t)$ , что практически осуществляется путем минимизации стабилизирующего функционала:

$$\Omega(R) = \int_0^{\infty} \left[ a \left( \frac{dR}{dt} \right)^2 + b R^2 \right] dt, \quad (\text{Пр.3})$$

где  $a, b$  — константы.

В рамках данной задачи используем полученное на этой основе соотношение:

$$\Omega(R) = \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N \frac{S_i S_j (1 + P_i R_j)}{P_i + P_j}.$$

Можно показать, что наиболее подходящим является показательный ряд  $\{P_i\}$  с основанием 2:

$$\{P_i\} = \{1 + |2^{i-M}\}, i = 1, 2, \dots, N, \quad (\text{Пр.4})$$

где  $M$  — параметр, позволяющий увеличивать число членов ряда при сохранении условия  $2^{N-M} \Gamma < 2 k_b \Delta \omega$ .

Специально проведенные исследования показывают, что относительная ошибка при определении  $\varphi(t)$  в рамках данного метода не превышает относительную ошибку при определении  $g(\omega)$ . Мёсбауэровская фурье-спектроскопия позволяет значительно расширить временные характеристики метода и регистрировать динамику в интервале от 100 пс до  $\sim 1$  мкс. На кафедре биофизики Биологического факультета МГУ разработан совместно с ИХФ АН СССР комплекс программ, с помощью которого реализован фурье-анализ мёсбауэровских спектров.

На кафедре биофизики Биологического факультета Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова имеются программы с подробным описанием для ЭВМ.

1. Программа решения системы дифференциальных уравнений методом Рунге — Кутта.
2. Программа идентификации параметров системы дифференциальных уравнений методом Хука — Дживса.
3. Программа ОРТИМА.
4. Программа разложения спектров КД.
5. Программа предсказания вторичной структуры белка.

Эти программы используются в практике для обучения студентов и могут быть предоставлены для использования в учебном процессе.

## РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

### К главам I, II

- Гуринович Г. П., Севченко А. Н., Соловьев К. Н.* Спектроскопия хлорофилла и родственных соединений. Минск, 1968.  
*Калверт Дж., Питтс Дж.* Фотохимия. М., 1968.  
*Паркер С.* Фотолюминесценция растворов. М., 1972.  
*Современные методы исследования фотобиологических процессов/* Под ред. А. Б. Рубина. М., 1974.  
*Кантор Ч., Шиммел П.* Биофизическая химия. М., 1984. Т. 2.  
*Клейтон Р.* Фотосинтез. Физические механизмы и химические модели. М., 1984.

### К главе III

- Сверхкороткие световые импульсы/* Под ред. С. Шапиро. М., 1981.  
*Пискарскас А. С., Ротомскис Р. И.* Лазеры сверхкоротких световых импульсов в спектроскопии фотосинтеза//Итоги науки и техники. Сер. Биоптика. М., 1986. Т. 19. С.173—239.  
*Спектроскопия комбинационного рассеяния света в газах и жидкостях/* Под ред. А. Вебера. М., 1982.  
*Соловьев К. Н., Глазков Л. Д., Старухин А. С., Шкирман С. Ф.* Спектроскопия порфиринов: колебательные состояния. Минск, 1985.

### К главе IV

- Пёрвис Р.* Микроэлектродные методы внутриклеточной регистрации и ионофореза. М., 1983.  
*Приборы и методы для микроэлектродного исследования клеток/* Под ред. Б. Н. Вепринцева и И. В. Крастса. Пушкино, 1975.  
*Биофизика: практикум /* Под ред. П. Г. Богача. Киев, 1983.  
*Камман К.* Работа с ионселективными электродами. М., 1980.  
*Регистрация одиночных каналов/* Под ред. Б. Сакмана, Э. Неера. М., 1987.

### К главе V

- Привалов П. Л.* Калориметрические исследования растворов биополимеров // Итоги науки и техники. Сер. Молекулярная биология. М., 1975. Т. 6. С. 7—33.

### К главе VI

- Адамсон А.* Физическая химия поверхностей. М., 1979.  
*Богуславский Л. И.* Биоэлектрохимические явления на границе раздела фаз. М., 1978.  
*Ияков В. Г., Берестовский Г. Н.* Динамическая структура липидного бислоя. М., 1981.

## К главе VII

*Блюменфельд Л. А., Воеводский В. В., Семенов А. Г.* Применение электронного парамагнитного резонанса в химии. Новосибирск, 1962.

*Вертц Дж., Болтон Дж.* Теория и практические приложения метода ЭПР. М., 1975.

*Ингрэм Д.* Электронный парамагнитный резонанс в биологии. М., 1972.

*Лихтенштейн Г. И.* Метод спиновых меток в молекулярной биологии. М., 1974.

*Свободные радикалы в биологии /Под ред. У. Прайора.* М., 1979. Т. 1,2.

*Лундин А. Г., Федин Э. И.* Ядерный магнитный резонанс. Основы и применение. Новосибирск, 1980.

*Гюнтер Х.* Введение в курс спектроскопии ЯМР. М., 1984.

*Вертхейм Г.* Эффект Мёссбауэра. Принципы и применения. М., 1966.

*Гольданский В. Д.* Эффект Мёссбауэра и его применение в химии. М., 1963.

*Шпинель В. С.* Резонанс  $\gamma$ -лучей в кристаллах. М., 1969.

*Шайтан К. В., Рубин А. Б.* Конформационная подвижность и теория эффекта Мёссбауэра в биологических системах // Молекулярная биология. 1980. Т. 14. № 6. С. 1323—1335.

*Карманов В. Г.* Математическое программирование. М., 1980.

## К главе VIII

*Рубин А. Б., Пытьева Н. Ф., Ризниченко Г. Ю.* Кинетика биологических процессов. М., 1987.

*Свирижев Ю. М., Логофет Д. О.* Устойчивость биологических сообществ. М., 1978.

*Рубин А. Б., Шинкарев В. П.* Транспорт электронов в биологических системах. М., 1984.

*Химмельблау Д.* Прикладное нелинейное программирование. М., 1976.

## К главе IX

*Верхотуров В. Н., Рубин А. Б.* Автоматизация биофизических исследований. М., 1987.

*Глушков В. М.* Основы безбумажной информатикн. М., 1982.

*Египко Е. М., Аракелян В. В., Саркисянц Л. С.* Автоматизация микробиологических экспериментов. Киев, 1985.

*Ланцош К.* Практические методы прикладного анализа. М., 1961.

*Мясников В. А., Майоров С. А., Новиков Г. И.* ЭВМ для всех. М., 1980.

# ОГЛАВЛЕНИЕ

	Стр.
Предисловие . . . . .	3
Введение . . . . .	4
<i>Глава I. Спектральные методы исследования стационарных свойств биологических систем . . . . .</i>	<i>6</i>
§ 1. Основы метода абсорбционной спектроскопии . . . . .	8
§ 2. Повышение разрешающей способности при измерении спектров поглощения и необходимый предел разрешения . . . . .	13
§ 3. Основные принципы производной спектрофотометрии и методы измерения производных спектров . . . . .	15
§ 4. Методы поляризационной абсорбционной спектрофотометрии . . . . .	20
§ 5. Метод линейного дихроизма . . . . .	24
§ 6. Методы кругового дихроизма и дисперсии оптического вращения . . . . .	29
§ 7. Флуоресцентная спектроскопия. Общие закономерности, лежащие в основе флуоресцентной спектроскопии . . . . .	37
§ 8. Методы измерения спектров флуоресценции и возбуждения . . . . .	44
§ 9. Методы измерения квантовых выходов флуоресценции . . . . .	51
§ 10. Поляризация флуоресценции и методы ее измерения . . . . .	54
§ 11. Фосфоресценция и методы ее измерения . . . . .	68
<i>Глава II. Динамические спектральные методы исследования биологических систем . . . . .</i>	<i>75</i>
§ 1. Общие принципы дифференциальной абсорбционной спектрофотометрии . . . . .	76
§ 2. Метод однолучевой дифференциальной абсорбционной спектроскопии . . . . .	78
§ 3. Метод двухлучевой и двухволновой дифференциальной абсорбционной спектрофотометрии . . . . .	81
§ 4. Общая характеристика метода импульсной спектроскопии . . . . .	86
§ 5. Методы поляризационной дифференциальной абсорбционной спектрофотометрии (фотоселекция, спектры фотондуцированных изменений линейного и кругового дихроизма) . . . . .	88
§ 6. Метод температурного скачка при измерениях фотондуцированных изменений поглощения . . . . .	97
§ 7. Методы динамической спектрофлуорометрии . . . . .	98
§ 8. Методы измерения замедленной флуоресценции . . . . .	105
<i>Глава III. Лазерная спектроскопия . . . . .</i>	<i>111</i>
§ 1. Основы метода импульсной флуорометрии . . . . .	114
§ 2. Метод пикосекундной абсорбционной спектроскопии . . . . .	117
§ 3. Способ селекции лазерных импульсов по длительности . . . . .	119

§ 4.	Пикосекундный импульсный флуорометр . . . . .	122
§ 5.	Пикосекундный абсорбционный спектрометр . . . . .	131
§ 6.	Абсорбционный спектрометр наномиллисекундного временного диапазона. . . . .	136
§ 7.	Спектрометр комбинационного рассеяния . . . . .	138
<i>Глава IV.</i>	<i>Методы изучения ионной проницаемости биологических мембран . . . . .</i>	<i>144</i>
§ 1.	Микроэлектродные методы . . . . .	144
§ 2.	Свойства микроэлектродов . . . . .	148
§ 3.	Усилитель биопотенциалов . . . . .	152
§ 4.	Электрическая стимуляция клеток и измерение мембранной проводимости . . . . .	157
§ 5.	Ионные токи возбудимых мембран . . . . .	165
§ 6.	Техника стабилизации мембранного потенциала . . . . .	171
§ 7.	Применение метода фиксации напряжения . . . . .	176
§ 8.	Ионные каналы в плоском липидном бислое . . . . .	185
§ 9.	Измерение токов ионных каналов методом микроотведения . . . . .	190
§ 10.	Метод внутриклеточного диализа . . . . .	198
<i>Глава V.</i>	<i>Калориметрические методы исследования биополимеров и мембранных систем . . . . .</i>	<i>203</i>
§ 1.	Метод реакционной или изотермической микрокалориметрии . . . . .	205
§ 2.	Дифференциальная сканирующая микрокалориметрия . . . . .	207
§ 3.	Дифференциальные адиабатные сканирующие микрокалориметры . . . . .	210
§ 4.	Калориметрические измерения . . . . .	211
<i>Глава VI.</i>	<i>Монослой липидов на границе раздела воздух — вода . . . . .</i>	<i>217</i>
§ 1.	Методика измерения поверхностного натяжения с использованием пластинки Вильгельми . . . . .	218
§ 2.	Исследование свойств липидных монослоев методом изотерм . . . . .	220
§ 3.	Анализ и интерпретация форм изотерм . . . . .	222
§ 4.	Прикладное значение метода монослоев . . . . .	223
<i>Глава VII.</i>	<i>Методы радиоспектроскопии . . . . .</i>	<i>226</i>
§ 1.	Метод электронного парамагнитного резонанса . . . . .	226
§ 2.	Ядерный магнитный резонанс . . . . .	258
§ 3.	Исследование биологических объектов методами гамма-резонансной спектроскопии . . . . .	269
§ 4.	Обработка мессбауэровских спектров на ЭВМ . . . . .	279
<i>Глава VIII.</i>	<i>Математическое моделирование . . . . .</i>	<i>283</i>
§ 1.	Общие принципы построения моделей биологических явлений . . . . .	283
§ 2.	Рост биологической популяции в условиях ограниченности ресурсов. Непрерывное и дискретное описание . . . . .	287
§ 3.	Модель переноса электрона в фотосинтетической электрои-транспортной цепи. Выяснение типа взаимодействия переносчиков . . . . .	295
§ 4.	Идентификация математических моделей биологических процессов . . . . .	302
<i>Глава IX.</i>	<i>Автоматизация биофизических исследований . . . . .</i>	<i>308</i>
§ 1.	Общие вопросы . . . . .	308
§ 2.	Алгоритмические модели биофизического исследования . . . . .	309

§ 3. Типовая система автоматизации биофизического эксперимента . . . . .	314
§ 4. Программно-технический комплекс ЭПР-спектроскопии . . . . .	323
§ 5. Порядок работы на программно-техническом комплексе ЭПР-спектроскопии . . . . .	330
§ 6. Анализ информации в автоматизированных системах биофизического эксперимента . . . . .	336
Приложение . . . . .	352
Рекомендуемая литература . . . . .	355

Учебное издание

**Александр Александрович Булычев,  
Виктор Николаевич Верхотуров,  
Борис Алексеевич Гуляев и др.**

## **Современные методы биофизических исследований. Практикум по биофизике**

Заведующий редакцией А. Г. Гаврилов  
Научный редактор Ю. А. Русанов  
Редактор А. С. Орлова  
Младшие редакторы И. М. Павлова, Е. И. Попова  
Художественный редактор Т. А. Коленкова  
Художник Ю. Д. Федичкин  
Технический редактор Л. А. Муравьева  
Корректор Г. И. Кострикова

ИБ № 7160

Изд. № Е-541. Сдано в набор 17.08.87. Подп. в печать 10.02.88. Т-05073.  
Формат 60×88<sup>1/16</sup>. Бум. офсетная № 1. Гарнитура литературная. Печать офсетная.  
Объем 22,05 усл. печ. л.+0,25 усл. печ. л. форзац 22,54 усл. кр.-отт. 23,46 уч.-изд. л.+  
+0,44 уч.-изд. л. форзац. Тираж 11 000 экз. Зак. № 583. Цена 1 р. 20 к.  
Издательство «Высшая школа», 101430, Москва, ГСП-4, Неглинная ул., д. 29/14.

Московская типография № 4 Союзполиграфпрома  
при Государственном комитете СССР  
по делам издательства, полиграфии и книжной торговли  
129041, Москва, Б. Переяславская, 46