

**МЕЖИНСТИТУТСКИЙ СЕМИНАР  
«ПРОБЛЕМЫ СОВРЕМЕННОЙ ОПТИКИ  
И СПЕКТРОСКОПИИ»**

УДК 53.082.5.578.008.5

М. И. ШТОКМАН  
(Новосибирск)

**СПЕКТРОСКОПИЯ РАССЕЯННОГО СВЕТА  
В БИОЛОГИИ И БИОФИЗИКЕ \***

4.4. *Поляризационные измерения вращательной диффузии.* Возможно ли измерить вращательную диффузию малых частиц ( $ka \ll 1$ ) (к ним относятся все молекулы ферментов и большинство вирусов), а также при малоугловом рассеянии на больших частицах ( $qa \ll 1$ ), когда хорошо отделяется трансляционная диффузия? Положительный ответ на это дан Пекорой в [22], где был предложен метод деполяризованного рассеяния. Он применен к частицам, построенным из материала с оптической анизотропией (двулучепреломлением). Метод заключается в регистрации компоненты рассеянного света, нормальной по поляризации к падающему свету. Последний должен быть поляризован либо в плоскости рассеяния, либо нормально к ней (чистые  $\pi$ -,  $\sigma$ -поляризации). Идея метода [22] заключается в том, что анизотропия поляризуемости вследствие вращения частицы вызывает флуктуации поляризации рассеянного света, причем этот эффект не исчезает при  $qa \rightarrow 0$ . Кроме того, в отсутствие других источников деполяризации в корреляторе  $g^{(1)}(q, \tau)$  отсутствует слагаемое, отвечающее только пространственной диффузии и являющееся большим фоном при измерении вращательной диффузии.

Мы дополнительно учтем эффект, связанный с проявляемой большинством биологических микрообъектов оптической активностью [1] — вращением плоскости поляризации света. При рассеянии такие объекты деполяризуют свет, даже если являются изотропными. Рассмотрим малые частицы ( $qa \ll 1$ ), обладающие осевой симметрией. Амплитуда рассеяния света (21) билинейна по поляризациям фотонов, и ее наиболее общий вид в рассматриваемом случае

$$\begin{aligned} \chi_A(\lambda, \tau) = & \chi_I(e_0 e_\lambda^*) + (\chi_{\parallel} - \chi_{\perp}) \left[ (n e_0)(n e_\lambda^*) - \frac{1}{3}(e_0 e_\lambda^*) \right] + \\ & + \frac{i}{4} (\chi_R - \chi_L) \frac{k_1 + k_2}{k} [e_0 \times e_\lambda^*] + \chi_H [e_0 \times e_\lambda] n. \end{aligned} \quad (47)$$

Здесь  $\chi_I$  — изотропная часть поляризуемости;  $n(\tau)$  — единичный вектор в направлении оси симметрии частицы;  $\chi_{\parallel} - \chi_{\perp}$  — разница поляризуемости частицы вдоль и поперек оси симметрии частицы;  $\chi_R - \chi_L$  — разница поляризуемостей для право- и левополяризованных квантов;  $\chi_H$  — вклад, появляющийся при наличии спонтанного магнитного момента у частицы (он велик только для ферромагнитных частиц, и мы его далее учитывать не будем). Все коэффициенты в (47) не зависят от  $q$ .

\* Начало см. в № 1 за 1980 г.

Вычисляя форм-фактор частицы (27) для взаимно перпендикулярных поляризаций, получим

$$S_{A\perp}(\tau) = |\chi_{\parallel} - \chi_{\perp}|^2 e^{-6D_R\tau} + \frac{15}{16} (1 + \cos \Theta)^2 |\chi_R - \chi_L|^2. \quad (48)$$

Первое из слагаемых обусловлено анизотропией частицы; зависимость от времени  $\mathcal{F}_{20}(\tau)$  (ср. (40)) легко понять, поскольку зависимость от  $n$  в (47) носит квадрупольный характер. Второй член в (48) описывает деполяризацию вследствие оптической активности частицы и является фоновым для определения  $D_R$ ; при  $\chi_R = \chi_L$  (отсутствие оптической активности) мы приходим к обычно используемому результату [22].

Результат поляризационных измерений снова имеет вид (41), но в отличие от (42)  $\xi(q, \tau)$  здесь не малая константа при  $qa \rightarrow 0$ . Таким образом, измерение при малых временах ( $\tau \ll \tau_c \equiv (Dq^2)^{-1}$ ) дает возможность непосредственно определить коэффициент вращательной диффузии  $D_R$ . Такой подход был реализован в ряде работ. Удобным объектом для изучения явился вирус табачной мозаики (ВТМ), имеющий вид палочки с длиной порядка 100 нм ( $ka \sim 1$ ); для него также были проведены обычные (неполяризационные) измерения  $D_R$  [23—25], которые можно сравнить с поляризационными [26, 27]. Как и следовало ожидать, обычные измерения дают значения  $D_R$  с большим разбросом:  $D_R = (377 \pm 57) \text{ с}^{-1}$  (указан 80%-ный доверительный интервал по  $t$ -распределению Стьюдента); поляризационные измерения дают лучший результат:  $D_R = (345 \pm 15) \text{ с}^{-1}$ , однако малые размеры выборок (2 и 4 степени свободы соответственно) делают результат не слишком определенным статистически. Укажем, что воспроизводимость значения коэффициента трансляционной диффузии  $D$  в работах [23—25] также не очень хорошая:  $D = (0,37 \pm 0,09) \cdot 10^{-7} \text{ см}^2/\text{с}$ , что, возможно, связано со сложностью разделения вращательной и трансляционной диффузий. Действительно, по полученным результатам можно рассчитать, что отношение времен корреляции  $\tau_R/\tau_c = 1,1 \sin \Theta/2$  — порядка единицы.

4.5. *Поляризационная спектроскопия рассеянного света и биофизика ферментов.* Обсудим возможность применения поляризационной спектроскопии рассеянного света для изучения динамики функционирования ферментов. По современным представлениям функционирование ферментов связано с конформационными перестройками их молекул [1, 28]. Возможно, что во время функционирования при нормальных условиях молекулы фермента постоянно находятся в процессе перестройки (конформационно-неравновесное состояние) [28].

Можно ли извлечь информацию о быстрых циклических перестройках молекул ферментов из рассеянного света? Ниже мы предложим, как это следует сделать. Как уже обсуждалось, в частности в связи с (41), квазиупругое рассеяние нечувствительно к внутреннему состоянию малых ( $qa \ll 1$ ) частиц. Известно, что особо чувствительна к конформации макромолекул их оптическая активность (см. пп. 5.5, 5.6 в [1]), т. е. амплитуда  $\chi_R - \chi_L$ , входящая в (27). Следовательно, деполяризованное рассеяние, связанное с этой амплитудой, также должно обладать высокой чувствительностью к конформации.

Функция корреляции для ортогональной поляризации  $g_{\perp}^{(1)} = S_{\perp} \times \times(q, \tau)/S_{\perp}(q, 0)$ , описывающая это явление, выражается в виде

$$S_{\perp}(q, \tau) = e^{-q^2 D \tau} \left\{ |\chi_{\parallel} - \chi_{\perp}|^2 e^{-6D_R \tau} + \frac{15}{16} (1 + \cos \Theta)^2 G_R(\tau) \right\},$$

$$G_R(\tau) = \langle [\chi_R(\tau) - \chi_L(\tau)][\chi_R(0) - \chi_L(0)]^* \rangle. \quad (49)$$

Информация о конформационных перестройках содержится в зависимости от времени коррелятора  $G_R(\tau)$ , описывающего релаксацию оптической активности молекулы. Функция  $G_R$  осциллирует с характерным временем  $\tau_0$ , равным периоду цикла фермента (обычно от миллисекунд

до долей секунды), и убывает с характерным временем  $\tau_d$  того же порядка, определяемым дисперсией периодов цикла. Кроме того,  $G_R(\tau)$  имеет резкое падение на малых временах (порядка миллисекунды), за которые происходят конформационные перестройки молекулы после элементарных актов реакции. Таким образом, коррелятор  $G_R(\tau)$  несет существенную биофизическую информацию.

Какие характерные времена изменения  $G_R(\tau)$  могут быть зарегистрированы? Легко проводятся измерения при  $\tau \gg \tau_R = 1/6D_R \sim 10^{-7}$  с (для типичного фермента), когда первый член в выражении для  $g_{\perp}$  (49) исчезает. Отделение от пространственной диффузии возможно путем использования малоуглового рассеяния ( $\sin^2 \Theta/2 \ll 1/4Dk^2\tau \sim 4 \cdot 10^{-5}$  с/τ). Возможны также измерения при  $\tau \ll \tau_R$ , т. е. во всем требуемом диапазоне. Предлагаемый подход, однако, встречается с общей трудностью поляризационного метода: низкой интенсивностью деполяризованной компоненты (по оценкам  $10^{-3}$ — $10^{-4}$  от интенсивности рассеянного света). Отметим также, что среднюю по циклу фермента конформационную перестройку молекулы можно обнаружить обычным способом по изменению коэффициента диффузии при добавлении субстрата.

4.6. *Движение живых клеток.* Большинство изолированных живых клеток в суспензии или на каком-либо субстрате способно к активному движению; клетки также могут двигаться с током окружающей жидкости (крови, например) или во внешних полях (электрических, гравитационных и т. п.). Движение клеток несет важную информацию об их состоянии, жизнеспособности и т. п. Хотя наблюдение движения клеток возможно и визуально под микроскопом, спектроскопический метод имеет ряд преимуществ: количественность, производительность, возможность автоматизированного накопления статистики по клеткам и по времени.

Мы уже обсуждали в п. 2 возможность проведения измерения в двух режимах: одночастичном и многочастичном. В первом из них анализируется свет, рассеянный одной клеткой (такие измерения обычно делаются с помощью специального прибора — доплеровского микроскопа), и проводится усреднение по времени, а затем по разным клеткам. Во втором случае анализируется свет, рассеянный сразу многими клетками. При этом усреднение по клеткам автоматически проводится одновременно с усреднением по времени.

В любом случае основным результатом измерения является автокорреляционная функция  $g^{(1)}(\mathbf{q}, \tau)$ . Мы уже получили выражение (6) для  $g^{(1)}(\mathbf{q}, \tau)$  через распределение клеток по скоростям. При этом не были учтены два эффекта, которые могут быть существенными в ряде случаев: тепловая диффузия клеток и изменение скорости движения клеток за время  $\tau$ . Для того чтобы учесть эти эффекты, будем исходить из соотношений (26)—(29). Координату клетки  $\mathbf{r}_A$  можно разбить на два некоррелированных слагаемых: диффузионное смещение

$\mathbf{r}_D$  и активное смещение  $\mathbf{r}_M = \mathbf{r}_M(0) + \int_0^{\tau} \mathbf{v}(t) dt$ , где  $\mathbf{v}$  — скорость клетки.

Предполагая для простоты, что разные клетки движутся независимо, и отвлекаясь от их внутреннего движения, получим

$$g^{(1)}(\mathbf{q}, \tau) = e^{-q^2 D \tau} S_M(\mathbf{q}, \tau). \quad (50)$$

Здесь первый множитель описывает тепловую диффузию клетки с коэффициентом диффузии  $D$ , а второй — активное движение:

$$S_M(\mathbf{q}, \tau) = \left\langle e^{i\mathbf{q} \int_0^{\tau} \mathbf{v}(t) dt} \right\rangle; \quad (51)$$

усреднение  $\langle \dots \rangle$  идет по скоростям данной клетки и по различным клеткам.

Теперь рассмотрим предельный случай, когда за время  $\tau$  скорость клетки не меняется:  $qv = \text{const}$ . Тогда усреднение по скоростям в (51) можно провести путем интегрирования с плотностью  $P(v)$  распределения различных клеток по скоростям, и мы получим

$$S_M(q, \tau) = \int d^3v P(v) e^{iqv\tau} \quad (52)$$

— результат, эквивалентный (5); его особенностью является зависимость от комбинации параметров  $q\tau$ .

В противоположном предельном случае характерное время  $\tau_0$  изменения скорости клетки значительно меньше  $\tau$ . Если эти изменения случайны по направлению, то  $S_M(q, \tau)$  имеет универсальный вид (для однородной популяции), типичный для трансляционной диффузии с зависимостью от  $q^2\tau$  в суперпозиции с упорядоченным движением со средней скоростью  $\langle v \rangle$  (ср. (15), (33)):

$$S_M = e^{-q^2 D_M \tau} e^{iq \langle v \rangle \tau}; \quad D_M \equiv \langle v_q^2 \rangle \tau_0, \quad (53)$$

где  $D_M$  — коэффициент «активной» диффузии, пропорциональный среднеквадратичной скорости клетки  $\langle v_q^2 \rangle$ ;  $v_q \equiv qv/q$ .

В общем случае получить замкнутый ответ для произвольных  $\tau$  невозможно. Для иллюстрации приведем результат для модельного случая, когда  $v(t)$  является гауссовой случайной величиной с коррелятором  $w(t)$ :

$$P(v) = (\pi \langle v^2 \rangle)^{-3/2} \exp(-v^2 / \langle v^2 \rangle), \\ w(t) = 1/q^2 \langle qv(t) qv(0) \rangle = e^{-t/\tau_0} \langle v_q^2 \rangle. \quad (54)$$

Тогда для  $S_M$  (51) справедливо точное выражение

$$S_M(q, \tau) = \exp \left\{ -q^2 \langle v_q^2 \rangle \tau_0 \left( \frac{\tau}{\tau_0} - 1 - e^{-\tau/\tau_0} \right) \right\}, \quad (55)$$

интерполирующее между (52) при  $\tau \ll \tau_0$  и (53) при  $\tau \gg \tau_0$ .

Из изложенного выше ясно, что спектроскопия рассеянного света в принципе позволяет найти распределение клеток по скоростям  $P(v)$  и среднее время  $\tau_0$  поступательного движения клеток. Для того чтобы эту информацию можно было извлечь, необходимо выполнять следующие независимые условия:

$$\tau, \tau_0 \gg \frac{D}{\langle v_q^2 \rangle} \sim 10^{-3} \text{ с}, \quad \tau_0 \gg \frac{1}{q \langle v \rangle} \geq 10^{-2} \text{ с}, \quad (56)$$

первое из которых обеспечивает возможность отделения от обычной диффузии, а второе — от активной диффузии;  $\langle v \rangle$  — характерная скорость активного движения клетки. Численные оценки приведены для типичной клетки:  $a = 2$  мкм,  $\langle v \rangle = 10$  мкм/с. При выполнении этих условий пассивная диффузия всегда незначительна и  $g^{(1)}(q, \tau) \simeq S_M(q, \tau)$ .

Для получения  $P(v)$  и  $\tau_0$  необходимы следующие операции. Проводится измерение  $g^{(1)}(q, \tau)$  при  $\tau \ll \tau_0$ ;  $P(v)$  вычисляется фурье-обращением (52), причем второе из неравенств (56) гарантирует справедливость этого соотношения во всей существенной области  $\tau \sim (q \langle v \rangle)^{-1}$ ; контролем может служить зависимость  $g^{(1)}(q, \tau)$  только от комбинации  $q\tau$  (ср. (52), (55)). Затем с помощью  $P(v)$  вычисляется  $\langle v_q^2 \rangle$ . Далее измеряется  $g^{(1)}(q, \tau)$  при  $\tau \gg \tau_0$ ; контролем служит выполнение (53), что дает значение  $D_M$  и вместе с  $\langle v_q^2 \rangle$  значение  $\tau_0$ .

Распределение  $P(v)$  было определено в [12] описанным выше способом для кишечной палочки *E. coli*. Результаты измерения  $|g^{(1)}(q, \tau)|^2$  для разных углов рассеяния приведены на рис. 3 как функция  $q\tau$ . Ввиду изотропности суспензии,  $g^{(1)}(q, \tau)$  и  $P(v)$  зависят только от модулей  $q$  и  $v$  соответственно и  $g^{(1)}(q, \tau)$  является действительной функцией. То, что значения  $g^{(1)}(q, \tau)$  на рис. 3 хорошо ложатся на одну

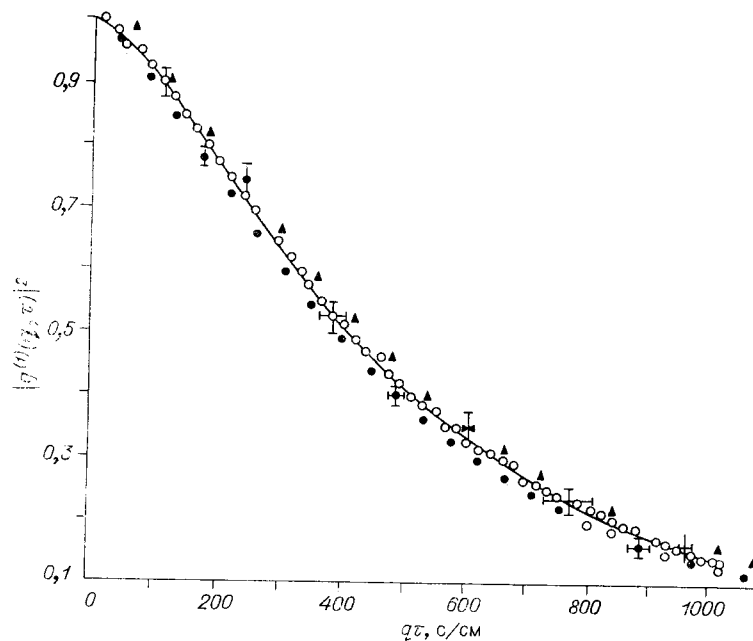


Рис. 3. Автокорреляционная функция света, рассеянного на суспензии живых бактерий *E.coli* для трех углов рассеяния  $\Theta$  в зависимости от  $q\tau$ : треугольники —  $\Theta=70^\circ$ , черные кружки —  $\Theta=50^\circ$ , светлые кружки —  $\Theta=20^\circ$  [12].

кривую, свидетельствует, что условие  $\tau < \tau_0$  выполняется. Вычисляя максимальное  $\tau$  по данным рис. 3, мы получили ограничение снизу:  $\tau_0 > 2,5 \cdot 10^{-2}$  с, что не противоречит условиям применимости (56). На рис. 4 приведен результат [12] вычисления распределения по абсолютным скоростям клеток  $P_s(v) = 4\pi v^2 P(v)$  с помощью фурье-обращения  $g^{(1)}(q, \tau)$ , которое в изотропном случае принимает простой вид

$$P(v) = q^2 / (2\pi)^2 v \int_0^\infty |g(q, \tau)| \tau \sin(qv\tau) d\tau, \quad (57)$$

эквивалентный (6).

Фурье-обращение, требуемое в корреляционном методе для вычисления  $P(v)$ , неудобно и приводит к паразитным осцилляциям [5]. Поэтому при исследовании движения клеток значительно удобнее использовать спектральный анализ рассеянного света, поскольку спектр  $g(\mathbf{q}, \omega)$  прямо связан с распределением  $P_q(v_q)$  клеток по проекции скорости на  $\mathbf{q}$  (ср. (5)):

$$P_q(v_q) = g(\mathbf{q}, \mathbf{q}, v_q), \quad (58)$$

а распределение клеток по абсолютным скоростям дается в (6).

Спектральный анализ был использован в [29] и позже в [13] для исследования спермы, результаты которого могут иметь важное практическое применение в искусственном осеменении и диагностике бесплодия. В этих работах подвижность сперматозоидов оценивалась качественно по ширине спектра  $g(\mathbf{q}, \omega)$ . В [13]

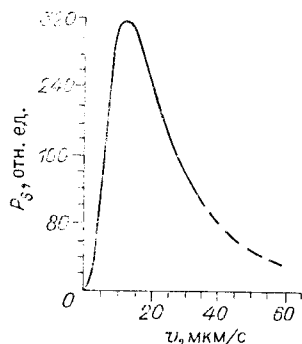
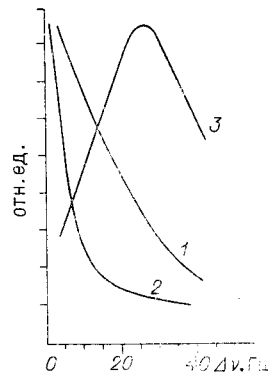


Рис. 4. Вычисленное распределение бактерий *E.coli* по абсолютным скоростям  $P_s(v) \equiv 4\pi v^2 P(v)$  как функция скорости  $v$  [12].

Рис. 5. Спектр света  $g(\Delta\nu)$ , рассеянного на сперме кролика (кривая 1 — живые, кривая 2 — погибшие сперматозоиды), как функция смещения частоты  $\Delta\nu \equiv \Delta\omega/2\pi$  [29]; кривая 3 — рассчитанное по формуле (6) распределение живых сперматозоидов по скоростям движения; 1 Гц смещения частоты соответствует скорости движения  $\approx 0,4$  мкм/с.



была найдена хорошая линейная корреляция между визуальной оценкой подвижности и шириной  $g(q, \omega)$  и отмечено, что спектральный метод невозмущающий, количественный, а также позволяющий накопить статистику по большому ( $\geq 10^4$ ) числу клеток. Чтобы показать возможность количественного исследования, мы привели на рис. 5 спектр из работы [29] и распределение клеток по абсолютным скоростям  $P_s(v)$ , которое мы рассчитали по этому спектру согласно (6). При исследовании спермы не менее важной, чем распределение по абсолютным скоростям  $P_s(v)$ , характеристикой является среднее время поступательного движения  $\tau_0$ , поскольку частое хаотическое изменение направления движения сперматозоидов является одной из причин бесплодия. К сожалению, в работах [29, 13] величина  $\tau_0$  не определена.

4.7. *Исследование макромолекул в растворах.* В этом разделе мы рассмотрим две недавно выполненные экспериментальные работы. Первая из них [9] касается исследования температурной денатурации вирусной ДНК. Как известно [1], при температуре около  $80^\circ\text{C}$  двухцепочечная нативная ДНК денатурирует («плавится»): молекула ДНК разделяется на две нити, которые сворачиваются в полиэлектролитные клубки. Денатурация сопровождается изменением всех физико-химических свойств ДНК, в том числе коэффициента диффузии, и может быть зарегистрирована методами спектроскопии рассеянного света. Изучение денатурации (и ренатурации) ДНК позволяет получить важную информацию о ее структуре, одним из таких примеров является рассматриваемая работа [9].

Исследовалась ДНК, выделенная из фага M1, в растворе концентрации 17 мг/л. Эта ДНК имеет молекулярный вес  $M_w \sim 10^7$  и соответственно длину молекулы  $L \sim 5$  мкм; ее плавление происходит между  $78,58$  и  $84,12^\circ\text{C}$ , как следует из наблюдений гиперхромизма. При исследовании температура раствора  $T$  повышалась со скоростью не более  $2$  град/ч и проводились измерения автокорреляционной функции рассеянного света для 22 значений  $T$  вблизи области фазового перехода и для нескольких значений угла рассеяния при каждой температуре. Измерения проводились на 400-канальном корреляторе «Saicor-43A».

Было обнаружено, что в корреляционной функции  $g^{(1)}(q, \tau)$  имеются две компоненты — быстрая и медленная. Хорошее описание экспериментальной зависимости дает сумма двух экспонент:

$$g^{(1)}(q, \tau) = (1 - \alpha) e^{-\Gamma\tau} + \alpha e^{-\Gamma_\alpha\tau}. \quad (59)$$

Обработка экспериментальных данных проводилась подгонкой трех параметров —  $\alpha$ ,  $\Gamma$ ,  $\Gamma_\alpha$ . Оказалось, что величины  $\Gamma$  и  $\Gamma_\alpha$  отличаются на два порядка; поэтому две экспоненциальные зависимости в (59) хорошо разделяются. Было проверено, что  $\Gamma$  и  $\Gamma_\alpha$  пропорциональны  $g^2 \propto \sin^2 \Theta/2$

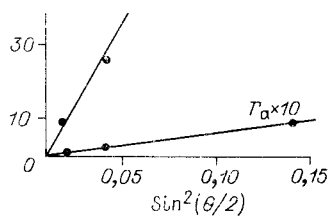


Рис. 6. Значения нормальной  $\Gamma$  и аномальной  $\Gamma_\alpha$  ширины корреляционной функции света, рассеянного на растворе ДНК в зависимости от  $\sin^2\Theta/2$  ( $\Theta$  — угол рассеяния): прямые — линии линейной регрессии [9].

длина молекулы  $L = M_w/19$  нм, поперечник  $l = 3,4$  нм (максимальный диаметр спирали), получаем согласно (40)  $D = 0,7 \cdot 10^{-8}$  см<sup>2</sup>/с. Столь хорошее количественное согласие с экспериментальным значением  $D$  (61) является, конечно, случайным, поскольку модель макроскопического жесткого стержня в вязкой жидкости для молекулы ДНК слишком груба; хорошим можно было бы считать согласие в пределах фактора 2—3.

Чему тогда отвечает второе слагаемое (медленная зависимость) в (59)? Тривиальное предположение о наличии в растворе пылинок с диаметром порядка 80 мкм кажется маловероятным, так как такие пылинки давали бы большое сильно флуктуирующее рассеяние вперед и были бы замечены. Авторы работы [9] обсуждают три возможности. Первая из них — эффект внутренних мод — сразу же отбрасывается, так как зависимость  $\Gamma_\alpha \propto q^2$  свидетельствует о пространственной диффузии. Кроме того, в этом случае на временах  $\tau \sim \Gamma_\alpha^{-1}$  корреляционная функция имела бы экспоненциальную малость  $e^{-\Gamma/\Gamma_\alpha} \sim e^{-100}$ , чего на самом деле не наблюдается. Вторая возможность — диффузия в ограниченном объеме. Хотя размер этого объема  $R \leq \sqrt{D/\Gamma_\alpha} \approx 2$  мкм и является слишком малым для макроскопических ограничений (например, размера кюветы) в установке, он сравним как со средним межмолекулярным расстоянием (около 0,7 мкм), так и с длиной молекулы ДНК ( $\sim 3$  мкм). Таким образом, в принципе возможно образование медленно диффундирующего комплекса молекул ДНК, хотя эффективный гидродинамический радиус ( $\approx 40$  мкм) такого комплекса, конечно, очень велик и нуждается в объяснении. К медленной зависимости автокорреляционной функции приводит также ограниченность измерительного объема [30], но этот эффект предсказывает зависимость от  $q^2$ , отличную от (60). Третья возможность — анизотропная диффузия, которая возникает из-за того, что коэффициент пространственной диффузии молекулы ДНК в некотором направлении зависит от ее ориентации по отношению к этому направлению. Рассмотрим этот эффект подробнее.

Молекулы ДНК в растворе в условиях рассматриваемого эксперимента представляют собой полидисперсную систему, поскольку характерное время их реориентации [ср. с (38) и обсуждением этого соотношения]

пример такой проверки приведен на рис. 6, где найденные при разных углах рассеяния значения  $\Gamma$ ,  $\Gamma_\alpha$  отложены на графике как функции величины  $\sin^2\Theta/2$ . Найденные значения  $D$ ,  $D_\alpha$  вне области фазового перехода (плавления) ДНК слабо зависели от температуры и в среднем имели значения

$$D = (0,65 \pm 0,078) \cdot 10^{-8} \text{ см}^2/\text{с},$$

$$D_\alpha = (0,55 \pm 0,083) \cdot 10^{-10} \text{ см}^2/\text{с}. \quad (61)$$

Как можно интерпретировать эмпирический результат (59)—(61)? Первый член в (59), несомненно, отвечает трансляционной диффузии молекулы ДНК и имеет ожидаемое значение: полагая, что  $M_w = 10^7$ ,

$$\tau_R \sim L^2/D \sim 10 \text{ с} \quad (62)$$

превосходит типичное время даже для аномальной диффузии  $\Gamma_a^{-1}$ ,  $1 \text{ с} < \Gamma_a^{-1} < 10 \text{ с}$  (см. рис. 6). Поэтому при  $\tau < \tau_R$  усреднению по ориентации частицы  $\langle \dots \rangle_\psi$  подлежит не коэффициент диффузии, а функция  $g^{(1)}(q, \tau)$  при заданной ориентации:

$$g^{(1)}(q, \tau) = \langle e^{-Dq^2\tau} \rangle_\psi, \quad (63)$$

в то время как при  $\tau > \tau_R$  это усреднение выглядит как

$$g^{(1)}(q, \tau) = e^{-\langle D \rangle_\psi q^2 \tau}. \quad (64)$$

Однако, как мы уже обсуждали в конце п. 4.3, значения коэффициента диффузии, даваемые моделью эллипсоида [21], слабо зависят от ориентации частицы; для рассматриваемой ДНК это различие не превосходит 20%. Поэтому разница между (63) и (64) не очень существенна.

Мы покажем ниже, что принципиально другое явление — «пропеллер-эффект», впервые обсуждавшийся в [31] в связи с электрическим аналогом эффекта Фарадея, — приводит к увеличению коэффициента трения на два порядка и соответственно к уменьшению коэффициента диффузии для молекул ДНК, движущихся под малым углом к своей оси. Пропеллер-эффект заключается в том, что молекула, имеющая форму спирали, например ДНК, при движении вдоль своей оси со скоростью  $v_{\parallel}$  начинает вращаться вокруг этой оси с угловой скоростью  $\Omega_{\parallel}$ ,  $\Omega_{\parallel} \propto v_{\parallel}$ . Предсказанный в [31] аналог эффекта Фарадея есть весьма малый эффект, заключающийся в том, что такое вращение эквивалентно магнитному полю, и спиральные молекулы, движущиеся в электрическом поле в процессе электрофореза, будут дополнительно к собственной оптической активности вращать плоскость поляризации света.

Вращение молекулы приводит также к дополнительной диссипации энергии и, следовательно, к повышению коэффициента трения, причем этот эффект велик в отличие от эффекта [31]. Коэффициент трения  $\kappa_{\parallel}$  для движения молекулы вдоль оси при наличии пропеллер-эффекта выражается в виде

$$\kappa_{\parallel} = \kappa + \kappa_{\parallel R} (\Omega_{\parallel} / v_{\parallel})^2. \quad (65)$$

Здесь  $\kappa$  — коэффициент трения невращающейся молекулы;  $\kappa_{\parallel R}$  — вращательный коэффициент трения:  $\kappa_{\parallel R} = M_{\parallel} / \Omega_{\parallel}$ , где  $M_{\parallel}$  — момент сил, вызывающий вращение с угловой скоростью  $\Omega_{\parallel}$ . Из геометрических соображений ясно, что в отсутствие проскальзывания спирали относительно жидкости

$$\Omega_{\parallel} / v_{\parallel} = 2\pi / h, \quad (66)$$

где  $h$  — шаг спирали,  $h \approx 3 \text{ нм}$  для ДНК [1]. Для жесткого стержня диаметром  $l$  гидродинамика дает значение [32]

$$\kappa_{\parallel R} = \pi L l^2 \eta. \quad (67)$$

Комбинируя (65)–(67) с (40) и формулой Эйнштейна  $D\kappa = kT$ , получим для коэффициента диффузии вдоль оси молекулы

$$D_{\parallel} = \frac{kT}{\pi \eta L} \left[ \frac{3}{\ln 2L/l} + \left( \frac{2\pi l}{h} \right)^2 \right]^{-1}. \quad (68)$$

Оценка с приведенными выше значениями параметров показывает, что второе слагаемое в квадратных скобках в (68) — вклад вращательного трения — на два порядка превосходит первое слагаемое. Таким образом, действительно, пропеллер-эффект приводит к аномально высокому коэффициенту трения и, следовательно, к аномально медленной диффузии. Поэтому следует отождествить  $D_{\parallel}$  (68) с коэффициентом аномальной диффузии  $D_a$  в (59), (60), для которого находим

$$D_a = kTh^2 / (4\pi^3 \eta L l^2) = 0,53 \cdot 10^{-10} \text{ см}^2/\text{с}. \quad (69)$$



Численная оценка получена для рассматриваемой ДНК. Столь хорошее совпадение с экспериментальным значением (61) опять является случайным, однако важно, что мы объяснили два порядка разницы величин  $D$  и  $D_a$ .

Строго говоря, далее следовало бы выразить  $D_a$  как функцию угла между направлением движения и осью спирали и провести в (61) усреднение по этому углу. Количественно это сделать сложно, однако качественно ясно, что при некотором критическом угле появится проскальзывание, формула (66) перестанет быть справедливой и пропеллер-эффект вообще исчезнет. Предположим, что критический угол мал и во всем этом угле  $D_a$  сохраняет постоянное значение (69), а вне данного угла имеет место нормальная диффузия с коэффициентом (40). При этом получается в точности формула (59), причем  $\alpha$  — доля полного телесного угла, где есть пропеллер-эффект.

Следует еще учесть вращательную диффузию вокруг направлений, нормальных к оси спирали, которая приводит к выходу молекул из области пропеллер-эффекта и, следовательно, к затуханию второго члена в (59). По аналогии с другими эффектами вращательной диффузии это затухание является экспоненциальным (ср. (41)), что дает окончательное выражение для  $g^{(1)}(q, \tau)$ :

$$g^{(1)}(q, \tau) = \left(1 - \alpha e^{-\tau/\tau_R}\right) e^{-Dq^2\tau} + \alpha e^{-(D_0q^2 + \frac{1}{\tau_R})\tau} \quad (70)$$

(оценку  $\tau_R$  см. в (62)).

Согласно условиям работы [9]  $\tau < \tau_R$  и (70) сводится к (59), (60). Однако при малоугловом рассеянии аномальное диффузионное  $(D_a q^2)^{-1}$  и вращательное  $\tau_R$  времена сравниваются и различие между (70) и (59), (60) становится существенным. Экспериментальное подтверждение зависимости (70) послужило бы сильным доводом в пользу предложенного нами объяснения аномальной диффузии ДНК. Укажем также, что аномальная диффузия может быть обнаружена прямым седиментационным или электрофоретическим методом, только если весь опыт будет длиться менее  $\tau_R \sim 10$  с, что представляет значительные трудности, хотя в принципе возможно.

Если подтвердится, что пропеллер-эффект ответствен за аномальную диффузию, то его спектроскопическое исследование даст ценную информацию о структуре, в частности спиральности, макромолекул.

В рассматриваемой работе [9], однако, не проводится исследования аномальной диффузии в области плавления (фазового перехода); в этой области исследована лишь температурная зависимость нормальной диффузии (параметра  $\Gamma$ ). На рис. 7 приведена зависимость  $\Gamma$  от температуры в области фазового перехода. Вдали от этой области  $\Gamma$  несколько возрастает с температурой, по-видимому, следуя за изменением вязкости раствора. Вблизи области плавления на рис. 7 отчетливо видно некоторое падение  $\Gamma$ , вероятно, связанное с конформационной перестройкой («набуханием») ДНК; этот эффект обнаружен впервые. Вблизи начала фазового перехода, регистрируемого по гиперхромизму,  $\Gamma$  резко возрастает, затем начинается возрастание  $\Gamma$ , сопровождаемое осцилляциями. Тонкая струк-

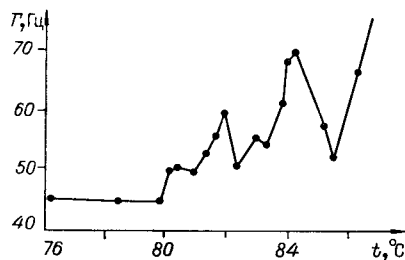


Рис. 7. Зависимость нормальной ширины  $\Gamma$  автокорреляционной функции света (угол рассеяния  $30^\circ$ ) от температуры в области фазового перехода ДНК [9].

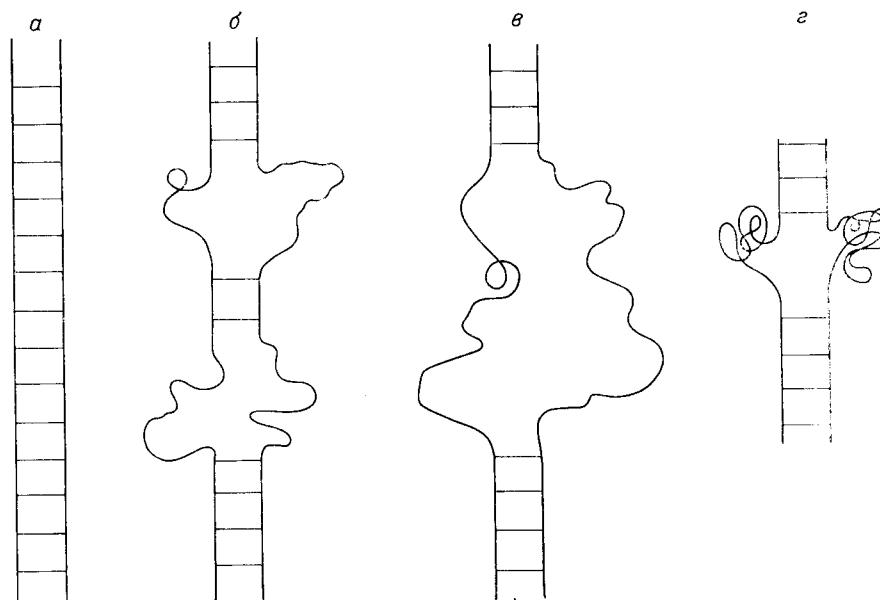


Рис. 8. Схематическое изображение предполагаемой картины плавления ДНК: *a* — нативная структура (поперечными черточками показаны связанные по Уотсону — Крику комплементарные основания); *б* — на двух близких участках нити разошлись флуктуации их движения дают вклад в увеличение  $\Gamma$  и оптической плотности ДНК (гиперхромизм); *в* — нити разошлись на всем плавящемся участке (точка максимума  $\Gamma$  и гиперхромизма); *г* — разошедшиеся нити сплелись в два клубка и флуктуации их движения уменьшились. Величина  $\Gamma$  уменьшилась по сравнению с точкой *в*, но установилась на более высоком уровне, чем в нативной структуре (*a*) вследствие уменьшения длины цепи. Гиперхромизм остался таким же, как и в точке *в*, поскольку стэкинг оснований ДНК не восстановился.

тура температурного профиля  $\Gamma$  (см. рис. 7) значительно более богата, чем та, которая видна по гиперхромизму. При увеличении  $q$  тонкая структура становится более выраженной, что свидетельствует о вкладе внутренних мод ДНК в ее формирование.

Как можно интерпретировать измеренную зависимость (см. рис. 7)? Наличие тонкой структуры фазового перехода свидетельствует о гетерогенности ДНК по ее длине. Поскольку пара  $A + T$  образует лишь две водородные связи, в то время как  $\Gamma + Ц$  образует три, ясно, что участки с преобладанием пар  $A + T$  оснований плавятся первыми. Из рис. 7 видно, что в молекуле исследованной ДНК имеются, по крайней мере, четыре макроскопических участка с разным содержанием пар  $A + T$ , соответствующих пикам при 80; 81,8; 82,9 и 84°C (в порядке убывания содержания  $A + T$ ). Увеличение  $\Gamma$  с ростом температуры связано с тем, что молекула нативной ДНК, имеющая в растворе форму гибкого стержня, постепенно сворачивается в два компактных клубка с большим коэффициентом диффузии.

С чем связаны осцилляции  $\Gamma$  и какую информацию они дают? Нам кажется правдоподобным и соответствующим наблюдаемой картине следующее предположение, проиллюстрированное на рис. 8. Плавление ДНК на ограниченном участке происходит в два этапа. Сначала рвутся водородные связи между нитями; этот процесс кооперативный и происходит в узком интервале температур. В этот момент нити начинают расходиться, с чем связан также гиперхромизм ДНК. В некотором узком интервале температур в начале области плавления (рис. 8, б) нити расходятся на небольших участках, образуя гибкие цепочки, которые флуктуируют (скручиваются, расходятся, сходятся и т. д.) и ведут себя подобно маленьким частицам с большими значениями коэффициента диффузии, что приводит к росту  $\Gamma$ . При дальнейшем повышении температуры нити

расходятся по всей длине плавящегося участка (рис. 8, в); эта точка соответствует максимуму  $\Gamma$  и гиперхромизма. Напомним, что гиперхромизм наблюдается при разрыве пар Уотсона — Крика и нарушении параллельности плоскостей оснований («Stacking»). В следующий момент разошедшиеся нити свиваются в два клубка, что ограничивает их подвижность (рис. 8, г); это соответствует резкому уменьшению  $\Gamma$  и почти неизменному гиперхромизму. В качестве иллюстрации укажем, что в точке  $84,12^\circ\text{C}$  гиперхромизм достигает насыщения; эта же точка близка к максимуму  $\Gamma$  и в нашей картине соответствует рис. 8, в. Далее освободившийся участок свивается в клубок (точка  $85,5^\circ\text{C}$ ), после чего вся молекула разделяется на два расходящихся клубка ( $86,5^\circ\text{C}$ ).

Таким образом, из работы [9] видно, что спектроскопия рассеянного света позволяет получить информацию о группировке пар оснований в ДНК и понять последовательность событий, происходящих при плавлении ДНК. Последнее обстоятельство может быть важным при понимании процессов с расплетанием нитей нативной ДНК, в частности транскрипции. В этом отношении было бы также важно изучать аналогичным образом ренатурацию ДНК, т. е. восстановление ее свойств после медленного понижения температуры. В описанной картине ренатурация является гораздо более вероятной в точках, левее максимумов  $\Gamma$ , чем в точках, правее этих максимумов; иначе говоря, прохождение максимума вносит элемент необратимости, так как соответствует образованию спутанного клубка.

Другая работа [11], которая нам представляется весьма интересной и которую мы ниже кратко обсудим, касается обнаружения образования комплекса антиген — антитело методами спектроскопии рассеянного света. Иммунологические реакции применяются сейчас во многих областях медицины, биохимии и биофизики для различных целей, в частности для идентификации макромолекул. Весьма важно было бы иметь метод, позволяющий быстро и количественно точно обнаружить образование комплекса антиген — антитело, а также ответить на вопросы о характере этого комплекса (его прочности, времени жизни, валентности антитела, количестве детерминант у антигена и т. п.). Хотя на некоторые из этих вопросов можно ответить классическими иммунологическими методами (см., например, [33]), однако эти методы весьма медленны и трудоемки, а также большей частью качественны. Например, реакция преципитации обычно может быть обнаружена за время от часа до суток, хотя образование первичного комплекса происходит за секунды или минуты [33].

Метод из [11] основан на простой идее, что при образовании комплексов между частицами в растворе их коэффициент диффузии падает и как следствие регистрируемое время корреляции растет. Исследовалась реакция между кровью и антисывороткой человека, объединение которых действительно приводило к увеличению времени корреляции по сравнению как с кровью, так и с антисывороткой. Этот эффект регистрировался сразу после объединения растворов и оказался иммуноспецифичным. Метод из [11] по чувствительности (малому количеству требуемой крови) и скорости превосходит известные методы; использовались, например, разведения крови до  $1:10^6$ .

Авторы [11] не привели измеренных корреляционных функций. Мы, однако, должны заметить, что ожидаемый сдвиг  $g^{(1)}(q, \tau)$  невелик и даже для эквимольных растворов, когда эффект максимален, не превосходит 10%. На рис. 9 приведены ожидаемые зависимости  $g^{(1)}(q, \tau)$ , вычисленные нами для эквимольных растворов при следующих реалистических параметрах: отношение средних молекулярных весов белков сыворотки и крови  $160\,000:70\,000$ ; как следствие этого отношение коэффициентов диффузии белков крови, сыворотки и их комплекса составляет  $D_1:D_2:D_3 = 5,2:4,0:3,5$  при отношении сечений рэлеевского рассеяния  $\sigma_1:\sigma_2:\sigma_3 = 1,6:8,4:17$ . Таким образом, в [11] показано, что образование первичного

комплекса антиген — антитело может быть зарегистрировано методами спектроскопии рассеянного света.

Какую еще информацию об иммуноспецифическом взаимодействии можно в принципе получить этими методами? Укажем, что по кинетике увеличения времени корреляции в зависимости от концентрации антител можно найти количество антигенных детерминант. Укажем также, что можно получить информацию о времени существования комплекса антиген — антитело. Как известно, реакция образования этого комплекса обратима, и, следовательно, его время диссоциации  $\tau_D$  конечно. Предполагая для простоты, что исследуются моновалентные антитела, образующие с антигеном комплекс 1 : 1, выпишем выражение для автокорреляционной функции с учетом эффекта диссоциации:

$$g^{(1)}(q, \tau) = (\sigma_1 n_1 + \sigma_2 n_2 + \sigma_3 n_3)^{-1} \left[ n_1 \sigma_1 e^{-D_1 q^2 \tau} + n_2 \sigma_2 e^{-D_2 q^2 \tau} + n_3 \sigma_3 e^{-(D_3 q^2 \tau + \tau_D^{-1}) \tau} \right], \quad (71)$$

где  $n$ ,  $\sigma$ ,  $D$  — соответственно концентрация, сечение рэлеевского рассеяния и коэффициент диффузии; индексы 1, 2, 3 относятся к свободному антигену и антителу и их комплексу. Из (71) очевидно, что малоугловое рассеяние при  $\tau \sim \tau_D \ll (D_3 q^2)^{-1}$  позволяет найти время диссоциации комплекса  $\tau_D$ .

**5. Исследование мембран.** К настоящему времени достоверно установлено, что важнейшие биологические процессы, в том числе окислительное фосфорилирование, первичный фотосинтез, рецепция, генерация и проведение нервных импульсов, связаны с биологическими мембранами. Эти мембраны представляют собой бимолекулярные фосфолипидные слои с толщиной гидрофобной части 5—7 нм, включающие в себя различные белки. Информацию о свойствах таких мембран получить очень сложно, и поэтому развитие спектроскопических методов их исследования весьма желательно. В этом разделе мы обсудим две недавно выполненные экспериментальные работы, имеющие принципиальную новизну и означающие, по нашему мнению, прогресс в обсуждаемом направлении.

Работа [34], представляющая значительный методический интерес, посвящена исследованию тепловых флуктуаций модельных бислоиных мембран из окисленного холестерина. Качественно исследованные явления, происходящие в мембране, могут быть описаны следующим образом. Макроскопически мембрана представляет собой пленку с поверхностным натяжением  $\sigma$ , погруженную в воду. Вдоль такой пленки могут распространяться поверхностные капиллярные волны («рипоны») с разными волновыми векторами  $Q$ , частота которых  $\omega_Q$  определяется в основном возвращающей силой и массой, т. е. поверхностным натяжением и плотностью жидкости  $\rho$ :

$$\omega_Q \approx \sqrt{\sigma Q^3 / 2\rho}. \quad (72)$$

Затухание (спектральная ширина) рипонов обуславливается вязкостью жидкости  $\eta$ . Длина волны рипонов в исследуемом диапазоне частот

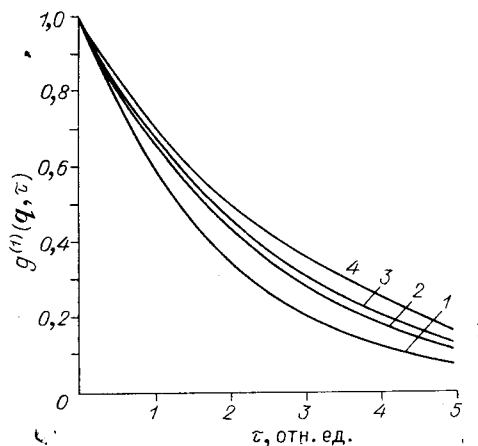


Рис. 9. Рассчитанная автокорреляционная функция  $g^{(1)}(q, \tau)$  света, рассеянного растворами сывороточного альбумина и антитела:

1 — альбумин; 2 — альбумин+антитело, когда комплекс не образуется; 3 — антитело; 4 — альбумин+антитело в случае образования комплекса.

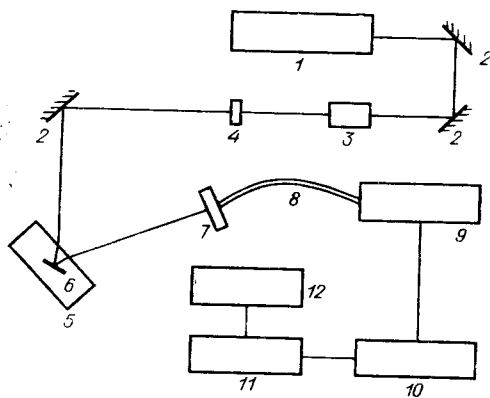


Рис. 10. Схема установки для исследования равновесных флуктуаций бислойных мембран [34]:

1 — лазер, 2 — зеркало, 3 — пространственный фильтр, 4 — фокусирующая линза, 5 — кювета, 6 — мембрана, 7 — диафрагма, 8 — стеклянный световод, 9 — фотоумножитель, 10 — фильтр верхних частот, 11 — спектральный анализатор (Saicor 51 A RTA), 12 — самописец.

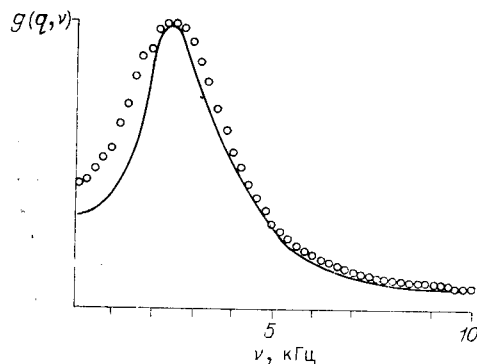


Рис. 11. Спектр рассеянного мембраной света как функция сдвига частоты  $\nu$  (точки):

сплошная кривая — теоретическая подгонка; волновой вектор рассеяния  $q = 813 \text{ см}^{-1}$  [34].

0,1—10 кГц составляет 40—125 мкм, что значительно превосходит толщину мембраны. Поскольку поверхностные волны проникают в жидкость на расстояние порядка собственной длины волны, то ясно, что плотность и вязкость жидкости, а не гораздо более тонкой мембраны, определяют их свойства. В эксперименте регистрировалось рассеяние на термически возбужденных (равновесных) риплонах; волновой вектор  $Q$  рассеивающего риплона отбирается в соответствии с условием Брэгга волновым вектором рассеяния:  $q = Q$ .

Из приведенных выше аргументов ясно, что исследование риплонов может дать информацию о поверхностном натяжении мембраны, а также плотности и вязкости жидкости в слое толщиной  $\sim 100 \text{ мкм}$  вблизи мембраны. Укажем, что эти свойства не обязательно совпадают с объемными, что, по нашему мнению, и определяет основное значение работы [34].

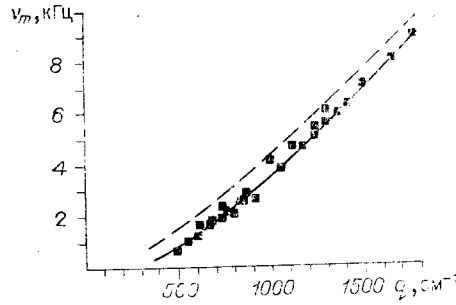
Схема эксперимента приведена на рис. 10 и представляет собой типичную схему оптического смешения с частотным анализом, причем роль опорного пучка играет отраженный от стенок кюветы лазерный свет. Измеренная функция  $g(q, \omega)$  при  $q = 813 \text{ см}^{-1}$  приведена на рис. 11. Частота максимума кривой отвечает частоте риплона  $\omega_q$ , ширина кривой определяется затуханием риплона. Из параметров  $\eta$ ,  $\rho$ ,  $\sigma$  по экспериментальным данным лучше всего определяется  $\sigma$ , так как частота риплона менее всего зависит от теоретической модели и аппаратных усреднений, а значение  $\rho$ , по-видимому, мало отличается от объемного (ср. (72)). На рис. 12 приведено сравнение с теорией зависимости  $\omega_q$  от  $q$ , найденной по серии кривых, подобных приведенной на рис. 11. Найденное значение  $\sigma = 2,5 \text{ дин/см}$  примерно на 20% превышает принятое значение  $\sigma$  для большого образца того же вещества.

Следует отдавать себе отчет, что метод [34] не может точно дать абсолютное значение  $\sigma$ , но позволяет довольно точно проследить за изменением  $\sigma$ . В частности, при дальнейшем окислении холестерина измеренная величина  $\sigma$  упала до 1,9 дин/см; относительная ошибка определения  $\sigma$  составила не более 20%.

Большой интерес представляло бы намеченное авторами работы [34] исследование влияния мембранных белков, а также переход на естественные биомембраны (или их фиксированные фрагменты), в частности на мембраны гигантских нейронов моллюсков и гигантских аксонов кальмара.

Рис. 12. Зависимость положения максимума спектра  $\nu_m$  от волнового вектора рассеяния  $q$  (точки):

штриховая линия — теория без учета аппаратной функции; сплошная линия — с учетом прямоугольной аппаратной функции [34].



В последней работе [35], которую мы обсудим, обнаружено уменьшение диаметра гигантского аксона рака примерно на 2 нм во время прохождения одиночного нервного импульса; этот эффект обнаружен впервые. Ниже мы постараемся понять, какими механизмами вызывается и какую информацию дает этот эффект, а также как он может быть использован для изучения нейрофизиологических явлений.

Схема эксперимента [35], приведенная на рис. 13, является типичной схемой гетеродинамирования с опорным пучком, сдвинутым по частоте на 40 МГц при помощи брэгговской ячейки. Нервное волокно (гигантский аксон рака), имеющее вид цилиндрической бислойной оболочки толщиной  $l \sim 7$  нм и радиусом  $R \approx 90$  мкм, было помещено в физиологический раствор в специальную кювету. В этой же кювете падали внешние (по отношению к аксону) электроды: два стимулирующих и на некотором расстоянии от них два регистрирующих электрода. Для усиления отражения света от волокна и устранения влияния электрооптических эффектов в мембране на поверхность волокна площадью  $\approx 400$  мкм<sup>2</sup> наносились крупинки золота размером  $\sim 3$  мкм; свет подводился к покрытой золотом области и отводился от нее с помощью стеклянного световода диаметром 80 мкм.

С другой точки зрения схема на рис. 13 является типичным интерферометром. Однако все схемы с опорным пучком есть, по существу, интерферометры. Разница с классической интерферометрией заключается в том, что роль одного из зеркал интерферометра играет рассеивающая частица (крупинки золота в данном случае), движение которой регистрируется. По сравнению с выше обсуждавшимися работами, эксперимент [35] обладает существенной спецификой: смещение отражающей частицы  $\Delta R$  значительно меньше длины волны света. Поэтому изменение фазы рассеянного света  $q\Delta R$  значительно меньше  $\pi$ ; как следствие этого на выходе фоторегистратора будет не гармонически изменяющийся сигнал  $I(t)$ , частота которого пропорциональна скорости движения частицы, а малый сигнал, повторяющий зависимость  $\Delta R$  от времени и перенесенный гетеродинамированием по частоте на  $f_c = +40$  МГц:

$$I(t) \sim \cos[2\pi f_c t + 2\Delta R(t)/\lambda + \varphi_0]. \quad (73)$$

Далее этот сигнал подавался не на обычный анализатор или коррелятор, а на специальную схему синхронного детектирования, сигнал на выходе которой был прямо пропорционален  $\Delta R(t)$ ; схема подавляла все низкочастотные флуктуации сигнала, связанные с медленными изгибами волокна. Чувствительность схемы позволяла при достаточном усреднении зарегистрировать субангстремные смещения отражающих частичек.

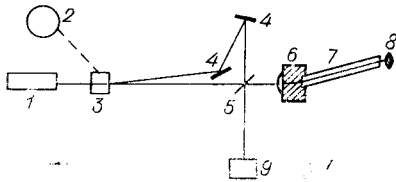


Рис. 13. Оптическая схема установки для измерения сжатия нервного волокна [35]: 1 — лазер, 2 — генератор частоты 40 МГц для питания брэгговской ячейки, 3 — брэгговская ячейка (акустооптический модулятор), сдвигающая отклоненный опорный луч по частоте на 40 МГц, 4 — зеркала, 5 — делитель луча, 6 — ячейка с жидкостью для согласования показателей преломления, 7 — световод, 8 — отражающая частица золота на волокне, 9 — фоторегистратор.

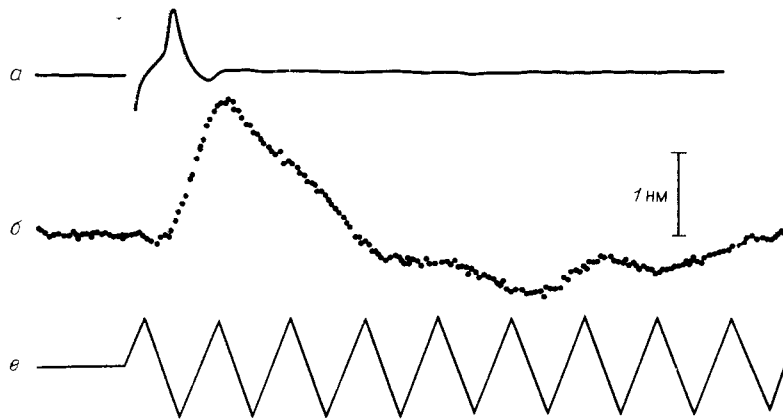


Рис. 14. Результаты эксперимента [35]:

*a* — потенциал действия в аксоне, зарегистрированный парой внешних электродов (амплитуда около 1 мВ); *b* — зарегистрированное механическое смещение поверхности аксона во времени, знак «+» отвечает сжатию аксона, произведено усреднение по 1400 событиям; *c* — треугольная волна меток времени с периодом 0,5 мс, начинающаяся в момент стимуляции аксона.

Для получения хорошего отношения сигнал/шум были синхронно со стимулирующей нервной импульса просуммированы 1400 событий. Результат — усредненное смещение  $\Delta R(t)$  — приведен на рис. 14, там же показаны потенциал действия и маркер времени. Положительные смещения соответствуют движению поверхности волокна от световода, т. е. сокращению волокна. Для того чтобы доказать, что наблюдается действительное сокращение (в диаметре) волокна, а не его изгиб, частички золота наносились на диаметрально противоположную световоду поверхность. При этом наблюдался сигнал, противоположный по знаку сигналу на рис. 14, в соответствии с ожидаемым для уменьшения диаметра. Было также доказано, что сокращение волокна происходит только при генерации им потенциала действия и это сокращение движется по волокну со скоростью распространения нервной импульса 1 см за 56 мкс.

Из рис. 14 видно, что амплитуда смещения в среднем составляет 1,8 нм. Интересна временная структура смещения  $\Delta R(t)$ : сокращение начинается через 0,25 мс после стимуляции и достигает максимума еще через 0,4 мс. Затем следует стадия релаксации: медленный ( $\sim 0,9$  мс) возврат к исходному диаметру, небольшое расширение и окончательный возврат к исходному значению; всего релаксация занимает 3,5 мс. Эти времена следует сравнить с длительностью зарегистрированного электрического события 0,58 мс, а также со временем 0,1 мс проведения импульса по волокну, имеющего длину 2 см.

Авторы работы [35] никак не интерпретируют полученные результаты, однако отмечают, что если существование и минимальный порядок величины сокращения диаметра волокна можно считать установленными, то форма этого сокращения (см. рис. 14) не может считаться окончательным результатом, поскольку отдельные события заметно различались по форме импульса. Поэтому мы сначала попытаемся объяснить порядок величины эффекта, а потом обсудим его ход во времени.

Поскольку первая (деполяризационная) часть потенциала действия сопровождается входом ионов во внутреннюю часть аксона (см., например, [36]), то электроосмотический эффект должен быть сразу же отброшен как предсказывающий изменение противоположного знака: при входе ионов осмотическое давление внутри волокна повышается и волокну должно расширяться, а не сжиматься, как наблюдается. К тому же оценка изменения радиуса волокна  $\Delta R$  при этом дает значение

$$\Delta R = C\Delta U / (enN_A) \sim 0,03 \text{ нм}, \quad (74)$$

на два порядка меньше фактического; это справедливо даже в большей мере для стадии слабой гиперполяризации. В (74)  $e$  — заряд электрона,  $N_A$  — число Авогадро, а также использованы следующие параметры: емкость мембраны  $C = 1$  мкФ/см<sup>2</sup>; величина потенциала действия  $\Delta U = 0,1$  В [36].

Единственное объяснение эксперимента [35], которое мы видим, — это эффект электрострикции оболочки (мембраны) нервного волокна, который качественно может быть описан следующим образом. Электростатическое давление на мембрану, возникающее при наличии трансмембранного потенциала  $U$ , резко уменьшается при деполяризации мембраны. Поскольку мембрана ведет себя как упругое тело (см., например, [37]), то при этом ее толщина  $l$  увеличивается на величину  $\Delta l$ ,  $\Delta l \ll l$ . Казалось бы, что этот эффект должен привести к увеличению радиуса волокна  $R$ . Это, однако, не так. Дело в том, что модуль объемного сжатия мембраны значительно превосходит все другие ее модули упругости. Следовательно, деформация мембраны происходит при ее неизменном объеме, что дает для изменения радиуса аксона  $\Delta R$  выражение

$$\Delta R/R = -\Delta l/l, \quad (75)$$

откуда видно, что  $\Delta R < 0$ , и поскольку  $R \gg l$ , то и  $|\Delta R| \gg \Delta l$ . Поэтому аксон как целое сжимается.

Теперь оценим величину эффекта электрострикционного сжатия. Кроме сил электростатического давления, существенны также силы трения (вязкие силы внутри мембраны и трение сокращающейся мембраны о воду, протекающую через нее). Заранее очевидно, что учет трения уменьшит рассчитанную величину эффекта. Поэтому мы для первой оценки трением пренебрежем, в результате чего получим завышенную величину для  $\Delta R$ .

Свободная энергия мембраны с учетом упругого и электростатического слагаемого имеет вид

$$F = [CU^2/2 + E(l-l_0)^2/2l_0]2\pi R, \quad (76)$$

где  $E$  — модуль поперечной упругости мембраны. Минимизируя  $F$  по  $l$  с учетом (75) и при  $RCU = \text{const}$ , найдем изменение толщины мембраны  $\Delta l$  и, комбинируя с (75), изменение радиуса аксона

$$\Delta R = (R\Delta U^2/2El) \left( C - l \frac{\partial C}{\partial l} \right). \quad (77)$$

Принимая для емкости мембраны  $C$  обычную зависимость  $C \propto l^{-1}$ , для модуля упругости — значение  $E = 10^9 - 10^{10}$  дин/см<sup>2</sup>, измеренное в [37] для искусственных мембран при частотах порядка килогерц, соответствующих длительности нервного импульса, для деполяризации мембраны — значение 70 мВ ( $\Delta U^2 = -(70 \text{ мВ})^2$ ), получим из (77) оценку

$$\Delta R = (RC/El)\Delta U^2 \sim -(1-10) \text{ нм}. \quad (78)$$

Полученный результат показывает, что при реалистических предположениях электрострикционный эффект может объяснить наблюдающееся уменьшение диаметра нервного волокна.

В заключение обсудим возможные причины разного хода потенциала действия  $U(t)$  и изменение радиуса волокна  $\Delta R$  во времени (см. рис. 14):  $\Delta R$  несколько запаздывает и имеет сильно растянутый задний фронт. Простейшая возможность — разные запаздывания потенциалов действия (спайков) относительно стимулирующего импульса — представляется маловероятной, так как это могло бы быть зарегистрировано электрическими измерениями.

Более вероятной причиной является трение мембраны о протекающую через нее воду. Если этот процесс описывается одним постоянным коэффициентом трения, то уравнение, описывающее  $\Delta R(t)$ , примет вид

$$\tau_0(d\Delta R/dt) + \Delta R - (RC/El)[U^2(t) - U^2(0)] = 0; \quad (79)$$



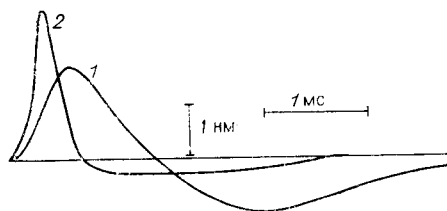


Рис. 15. Рассчитанная согласно (81) форма смещения поверхности аксона  $\Delta R(t)$  (кривая 1); потенциал действия (трансмембранный), использованный при расчете (кривая 2).

оно содержит одно время релаксации  $\tau_0$ , которое выражается через известную комбинацию коэффициента трения и  $E$ ,  $R$ ,  $l$ . Решение этого уравнения имеет вид

$$\Delta R(t) = (RC/El\tau_0)e^{-t/\tau_0} \int_0^t \Delta U^2(t') e^{t'/\tau_0} dt', \quad (80)$$

где  $\Delta U^2 = U^2(t) - U^2(0)$ . Когда  $\tau_0$  значительно меньше длительности импульса  $\tau_p$  (малое трение), (80) сводится к (77), как и следует. В противоположном предельном случае большого трения ( $\tau_0 \gg \tau_p$ ) при  $t \leq \tau_p$

$$\Delta R(t) = (RC/El\tau_0) \int_0^t \Delta U^2(t') dt'. \quad (81)$$

Таким образом, эффект оказывается подавленным в  $\sim \tau_p/\tau_0$  раз. При временах  $t$ , превышающих продолжительность импульса  $\tau_p$ :

$$\Delta R(t) = \Delta R(\tau_p) e^{-\frac{t-\tau_p}{\tau_0}}. \quad (82)$$

Изменение радиуса  $\Delta R$  достигает максимума в конце импульса ( $t = \tau_p$ ) и далее медленно спадает. Совпадение этих особенностей с экспериментом (см. рис. 14) является хорошим, хотя, возможно, и случайным. Сравнивая (80) с экспериментом, можно оценить значения параметров:  $E \approx 2 \cdot 10^9$  дин/см<sup>2</sup>;  $\tau_0 = 1,5$  мс. Полученное значение  $E$  хорошо согласуется с типичными значениями для модельных мембран [37]. На рис. 15 показан результат расчета  $\Delta R(t)$  по формуле (81) при указанных значениях параметров, а также использованный при расчете типичный потенциал действия в аксоне [36]. Как видно, расчет воспроизводит многие качественные особенности эксперимента (см. рис. 14).

Таким образом, эксперимент по оптическому измерению стрижки нервного волокна позволяет получить уникальную информацию о модуле упругости и проницаемости его мембраны. Разумеется, большой интерес представлял бы подобный эксперимент на нейронах; в частности, эффект стрижки мог бы быть использован для исследования взаимодействия нейронов в нервных сетях корреляционно-оптическим методом [38].

В заключение автор выражает благодарность В. И. Пасечнику за консультации по упругости мембран.

#### ЛИТЕРАТУРА

22. Pecora R. Spectrum of Light Scattered from Optically Anisotropic Macromolecules.—J. Chem. Phys., 1968, vol. 49, p. 4036.
23. Cummins H. Z., Carlson F. D., Herbert T. J., Woods G. Translational and Rotational Diffusion Constants of Tobacco Mosaic Virus from Rayleigh Linewidths.—Biophys. J., 1969, vol. 9, p. 518.
24. Fujime S. Quasi-Elastic Light Scattering from Solutions of Macromolecules. I. Doppler Broadening of Light Scattered from Solutions of Tobacco Mosaic Virus Particles.—J. Phys. Soc. Japan, 1970, vol. 29, p. 416.
25. Schaefer D. W., Benedek G. B., Schofield P., Bradford E. Spectrum of Light Quasielastically Scattered from Tobacco Mosaic Virus.—J. Chem. Phys., 1971, vol. 55, p. 3884.

26. Wada A., Suda N., Tsuda T., Soda K. Rotatory-Diffusion Broadening of Rayleigh Lines Scattered from Optically Anisotropic Macromolecules in Solution.—J. Chem. Phys., 1969, vol. 50, p. 31.
27. Schurr J. H., Schmitz K. S.—Biopolymers, 1973, vol. 12, p. 1021.
28. Blumenfeld L. A. The Physical Aspects of Enzyme Functioning.—J. Theor. Biol., 1976, vol. 58, p. 269.
29. Berge P., Volochine B., Billard R., Hamelin A. Mise en évidence du mouvement propre de microorganismes vivants grâce à l'étude de la diffusion inélastique de la lumière.—Comp. Rend. Acad. Sci. (Paris), 1967, t. D265, p. 889.
30. Schaefer D. W., Berne V. J. Light Scattering from Non-Gaussian Concentration Fluctuations.—Phys. Rev. Lett., 1972, vol. 28, p. 475.
31. Баранова Н. Б., Богданов Ю. В., Зельдович Б. Я. Новые электрооптические и магнитооптические эффекты в жидкости.—УФН, 1977, т. 123, с. 349.
32. Ландау Л. Д., Лившиц Е. М. Механика сплошных сред. М.—Л., Гостехиздат, 1944, т. II.
33. Петров Р. В. Введение в периферийную иммунологию. Новосибирск, Наука, 1968.
34. Grabowski E. F., Cowen J. A. Thermal Excitations of a Bilipid Membrane.—Biophys. J., 1977, vol. 18, p. 23.
35. Hill B. C., Schubert E. D., Nokes M. A., Michelson R. P. Laser Interferometer Measurements of Changes in Crayfish Axon Diameter Concurrent with Action Potential.—Science, 1977, vol. 196, p. 422.
36. Волькенштейн М. В. Общая биофизика. М., Наука, 1978, гл. 4.
37. Насечник В. И., Гнианик Т., Кузнецова Е. С. Реологические характеристики искусственных биологических мембран.—Механика полимеров, 1978, № 5, с. 924.
38. Штокман М. И. О корреляционно-оптическом методе изучения взаимодействия нейронов в нервных сетях.—Препринт № 96. Новосибирск, изд. ИЛАН СО АН СССР, 1979.

*Поступила в редакцию 28 июня 1979 г.*

---