

**СТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ МЕЖКЛЕТОЧНОГО РАСТВОРА,
ИНДУЦИРОВАННЫЕ ПРЯМОЙ ФОТОГЕНЕРАЦИЕЙ
СИНГЛЕТНОГО КИСЛОРОДА В СУСПЕНЗИИ ЭРИТРОЦИТОВ**

Г.В. Букин¹, Е.Б. Вольф², В.П. Данилов¹, С.Д. Захаров, А.В. Иванов³,
Т.М. Мурина¹, Е.Г. Новиков¹, Н.А. Панасенко, С.Н. Перов,
А.М. Прохоров¹, С.А. Скопинов⁴, М.И. Тимошечкин¹

В экспериментах по облучению насыщенной кислородом суспензии эритроцитов монохроматическим излучением оптического диапазона установлено, что спектральная зависимость квантового выхода процесса, приводящего к появлению экстремума в кинетике поляризуемости дисперсной среды, совпадает в интервале 750-800 нм со спектром фотоотклика диспергированной фазы и с ($^1\Sigma_g^+$, $^3\Sigma_g^-$) - полосой поглощения O_2 . Сделан вывод, что оба типа изменений обусловлены фотогенерацией синглетного кислорода и происходят одновременно.

Существование механизмов, посредством которых оптическое облучение различных клеток вызывает биологические эффекты нетеплового происхождения, долгое время ставилось под сомнение. Селективность по спектру и низкий порог по дозе облучения не согласовывались с наличием у биомакромолекул, считавшихся очевидными претендентами на роль первичных фотоакцепторов, широких линий и быстрой релаксации энергии возбужденных состояний в тепло. Недавно обнаружено, что искомым акцептором фотонов в клеточной суспензии являются молекулы растворенного кислорода 3O_2 , обладающие в видимом и ближнем ИК диапазоне узкими полосами запрещенных переходов (1O_2 , 3O_2) /1, 2/. При облучении образуется долгоживущий (10^{-6} с) синглетный кислород $^1\Delta_g$, высокая химическая активность которого в отношении биоструктур

¹ Институт общей физики АН СССР.

² Уральский политехнический институт.

³ Всесоюзный онкологический научный центр МЗ СССР.

⁴ Научно-инженерный центр экологической безопасности УрО АН СССР.

известна /3/.

Решение этой проблемы породило новый вопрос. Сводится ли развитие фотоиндуцированных эффектов к химической реакции $^1\text{O}_2$ с молекулярно-клеточными компонентами? Некоторые указания на то, что это не так, получены из экспериментов по наблюдению структурной альтерации метастабильных водных растворов, облучаемых светом с длиной волны, попадающей в одну из полос ($^1\text{O}_2$, $^3\text{O}_2$) /4/. Анализ показал, что вероятным первичным акцептором фотонов здесь также является растворенный $^3\text{O}_2$. Для объяснения имеющихся фактов в /5/ предложена гипотеза о том, что в неравновесных водных системах релаксация синглетного кислорода может сопровождаться изменением динамической структуры протяженной сетки водородных связей в жидкости. Одновременно происходят изменения поверхностной ультраструктуры погруженных в эту жидкость термодинамически неравновесных объектов, например, клеточных мембран. В основу гипотезы положена фрактально-кластерная модель водной среды /6/.

Несмотря на отсутствие данных о предполагаемых динамических структурах, были начаты эксперименты по поиску свидетельств их проявления в эритроцитарной суспензии, подвергаемой лазерному облучению в полосах ($^1\text{O}_2$, $^3\text{O}_2$). Использовалось то обстоятельство, что при непрерывной фотогенерации $^1\text{O}_2$ кинетическая зависимость клеточного отклика (коэффициента деформируемости эритроцитов ϵ) имеет характерный экстремум, величина которого примерно постоянна, а положение на оси времени t определяется длиной волны λ и плотностью потока облучения q /1, 2/. Предполагалось, что структурные изменения водной среды приблизительно в то же время также должны достигать экстремума. В качестве измеряемого параметра, характеризующего интегральные свойства межклеточной жидкости, был взят показатель ее преломления n , значение которого на оптических частотах пропорционально поляризуемости среды /7/. В работе /8/ изменения n были обнаружены, причем обе кинетики оказались аналогичными и положения экстремумов действительно совпали.

Естественно предположить, что положение экстремума $t_m^{(n)}$ для кинетики $n(t)$ при облучении внутри полосы ($^1\text{O}_2$, $^3\text{O}_2$) будет определяться значениями λ и q . В таком случае, по аналогии с методом изучения фотоотклика клеток, можно измерить зависимость $t_m^{-1}(\lambda)$, приведенную к одному и тому же значению q , и сравнить ее с аналогичным спектром действия для клеток и со спектром поглощения $^3\text{O}_2$. Совпадение или, наоборот, различие спектров позволило бы более строго проверить предположение о единой причинной связи фотоиндуцированных изменений дисперсной среды и диспергированной фазы. Выполнению этой задачи посвящено данное сообщение.

Для облучения использовался лазер на кристалле $\text{Cr:AlBe}_2\text{O}_4$, перестраиваемый по длине волны с помощью призмы и вращающегося "глухого" зеркала. Активный элемент $6 \times 65 \text{ мм}^2$ накачивался

лампой ИНП-7х80 в стандартном квантроне К-107. При пропускании выходного зеркала 23% лазер имел пороговую энергию накачки 50-60 Дж, КПД $\approx 0,35\%$, максимальную энергию излучения в одиночном импульсе 0,9 Дж. В большинстве описанных ниже экспериментов лазер работал с частотой 10 Гц и энергией в импульсе 7-7,5 мДж. Средняя плотность потока внутри облучаемой суспензии составляла 40 мВт/см^2 , а объемная доля клеток в ней была $0,5\%$; температура $26 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$.

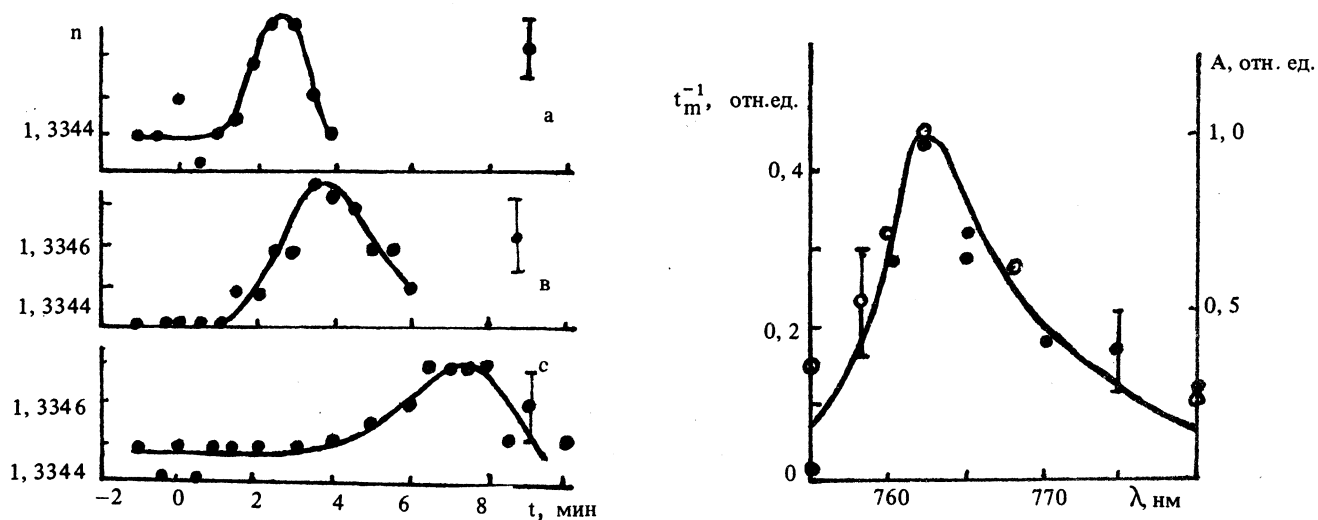


Рис. 1. Кинетические зависимости показателя преломления при непрерывном облучении суспензии эритроцитов на длинах волн 762 нм (а), 768 нм (б), 755 нм (с). Начало облучения в момент $t = 0$.

Рис. 2. Спектр возбуждения максимума фотоотклика суспензии эритроцитов в полосе 755-780 нм: \circ - показатель преломления, \bullet - коэффициент деформируемости эритроцитов из [2], и контур полосы поглощения O_2 в $\text{C}_2\text{Cl}_2\text{F}_3\text{I}$, соответствующий (O-O) переходу ${}^3\Sigma_g^- \rightarrow {}^1\Sigma_g^+$ из [9] (сплошная кривая).

Условия экспериментов описаны в [8]. Измерения n на длине волны $\lambda_0 = 589 \text{ нм}$ выполнялись

по методу Аббе на рефрактометре ИРФ-454Б с помощью регистрации угла полного внутреннего отражения φ_c : $n = n_0 \sin \varphi_c$. Зондирующие лучи распространялись под скользящими углами из кюветы в эталонную оптическую среду с $n_0 > n$. Чтобы исключить вклад клеток в измеряемое значение, их концентрация выбиралась таким образом, чтобы соблюдалось условие $\Delta l \gg \lambda_0$, где Δl - среднее расстояние между клетками. Дополнительные доказательства того, что изменения n в экспериментах вызваны изменением водной, а не клеточной компоненты суспензии, приведены в /8/.

Типичные зависимости $n(t)$ при непрерывном облучении суспензии эритроцитов приведены на рис. 1. Замечено, что в процессе облучения могут наблюдаться несколько максимумов $n(t)$, однако учитывался всегда первый из них.

Спектр действия в полосе 755-780 нм показан на рис. 2. Он построен в диапазоне линейности $t_m^{-1}(\bar{q})$ и приведен к среднему значению \bar{q} . Там же приведены спектры возбуждения клеточного эффекта из /2/ и контур полосы поглощения O_2 , соответствующий (O-O)-переходу ${}^3\Sigma_g^- \rightarrow {}^1\Sigma_g^+$ из /9/. В пределах экспериментальных ошибок все виды спектров совпадают как по положению максимума, так и по форме. Кроме того, наблюдалась корреляция температурных зависимостей Δn

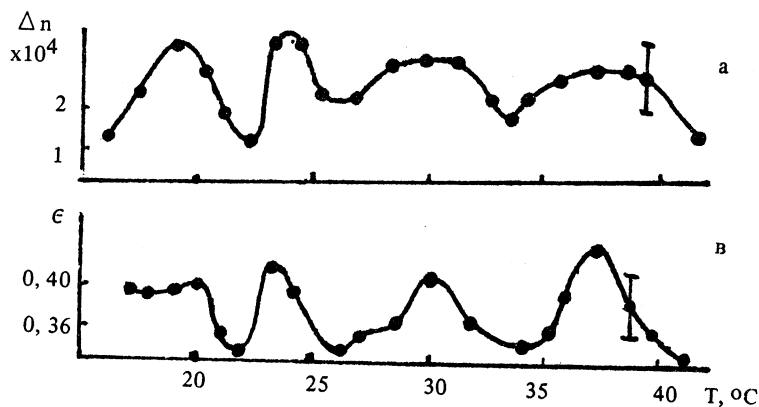


Рис. 3. Температурные зависимости показателя преломления суспензии эритроцитов (а) и коэффициента деформируемости эритроцитов (в). Объемная концентрация клеток 0,3%.

Спектр действия в полосе 755-780 нм показан на рис. 2. Он построен в диапазоне линейности $t_m^{-1}(\bar{q})$ и приведен к среднему значению \bar{q} . Там же приведены спектры возбуждения клеточного эффекта из /2/ и контур полосы поглощения O_2 , соответствующий (O-O)-переходу ${}^3\Sigma_g^- \rightarrow {}^1\Sigma_g^+$ из /9/. В пределах экспериментальных ошибок все виды спектров совпадают как по положению максимума, так и по форме. Кроме того, наблюдалась корреляция температурных зависимостей Δn (T) (Δn - разность между показателями преломления суспензии и физраствора) и ϵ (T) в интервале температур от 16 до 42 °С (рис. 3). Отчетливый параллелизм клеточных и внеклеточных изменений проявлялся также при наблюдении явления "детальной обратимости" на кривых $n(t)$ и $\epsilon(t)$ /10/.

Из полученных результатов следует, что характер изменений ϵ и n под влиянием различных факторов аналогичен, несмотря на разную природу этих параметров, и при облучении обусловлен генерацией синглетного кислорода. Химическая активность 1O_2 в отношении биополимеров известна, однако 1O_2 не вступает в реакции с компонентами водного раствора (ионами). Если же предположить, что взаимодействие 1O_2 с клетками индуцирует выброс из них в среду каких-то веществ, приводящих к изменению n , то это оказывается в противоречии с эффектом "детальной обратимости" для n : после прекращения облучения возврат n и ϵ к исходным значениям происходит полностью и примерно с той же скоростью, как и при облучении, хотя объем водной среды в десятки раз превышает объем, занимаемый клетками. Альтернативное предположение о

Из полученных результатов следует, что характер изменений ϵ и n под влиянием различных факторов аналогичен, несмотря на разную природу этих параметров, и при облучении обусловлен генерацией синглетного кислорода. Химическая активность 1O_2 в отношении биополимеров известна, однако 1O_2 не вступает в реакции с компонентами водного раствора (ионами). Если же предположить, что взаимодействие 1O_2 с клетками индуцирует выброс из них в среду каких-то веществ, приводящих к изменению n , то это оказывается в противоречии с эффектом "детальной обратимости" для n : после прекращения облучения возврат n и ϵ к исходным значениям происходит полностью и примерно с той же скоростью, как и при облучении, хотя объем водной среды в десятки раз превышает объем, занимаемый клетками. Альтернативное предположение о структурных изменениях водного раствора, согласованных с клеточными изменениями, предполагает существование дальних корреляций (десятки микрон) в эритроцитарной суспензии. Последняя величина близка к оценке (100 мкм) для длины корреляции электрических диполей воды, полученной в результате решения задачи о взаимодействии H_2O -диполей с квантованным электромагнитным полем /11/. При этом обнаруживается существование коллективных мод и появление перманентной электрической поляризации вокруг любой поляризованной примеси. Роль

подобных затравок могли бы играть многочисленные фиксированные заряды и диполи на поверхности клеточной мембраны.

Дополнительные выводы о наблюдаемых структурных изменениях можно сделать, если учесть результаты динамических расчетов в рамках модели, описывающей воду /12/ как сетку связанных водородными связями молекул /13, 14/, а также результаты Бульenkова /15/, который показал возможность образования из молекулы H_2O формальных периодических структур, производных от кристаллической алмазоподобной структуры льда 1Н, и установил, что природные биомакромолекулы имеют поверхности, дополнительные к найденным структурам. Объединяя эти данные, мы предполагаем, что "структуры Бульenkова" действительно существуют на поверхности эритроцитов, и их структурный "след", возникающий из-за взаимодействия водородных связей, простирается на десятки микрон. Взаимодействие клеток имеет коллективный характер и осуществляется через эти протяженные структуры. Полоса 1O_2 тушится такой структурой, вызывая перестройку самой структуры и периферийной области мембранной макромолекулы (например, белка). В момент t_m дальний порядок в водной среде исчезает. Модель позволяет качественно описать основные экспериментальные факты, в частности "детальную обратимость" /10/, и согласуется с концепцией /5/.

Данная модель позволяет оценить ожидаемое изменение $\Delta n = n(t_m) - n(0)$. Учтем, что в "структурах Бульenkова" положение протонов вполне упорядоченно /15/, поэтому в них возможна "протонная" проводимость вдоль Н-связей. Приближенно "следовую" структуру можно рассматривать как систему почти свободно движущихся "протонов" между фиксированными атомами кислорода, образующими правильную решетку. Тогда уравнение движения модельного "протона" в поле E имеет вид: $M\ddot{r} + (M/\tau)\dot{r} = qE$, где M и $q = \chi e$ - масса и заряд "протона", e - заряд электрона, χ - коэффициент экранирования "протона", τ - время затухания. Если в единице объема содержится N свободных зарядов, то, решая это уравнение для поля $E = E_0 \exp(-i\omega t)$, переходя к поляризации $P = Nqr$, а затем и к диэлектрической проницаемости $\hat{\epsilon} \approx n^2$, посредством $\hat{\epsilon}E = E + 4\pi P$ получим при $\omega\tau \gg 1$, $\chi = 0,32$

$$\Delta n \approx (4\pi Nq^2)/(n+1)M\omega^2 \approx 3 \cdot 10^{-4},$$

тогда как эксперимент дает $\Delta n \approx 2,5 \cdot 10^{-4}$.

ЛИТЕРАТУРА

1. Захаров С.Д., Еремеев Б.В., Перов С.Н. Краткие сообщения по физике ФИАН, №1, 15 (1989).
2. Данилов В.П. и др. Докл. АН СССР, 311, 1255 (1990).
3. Шинкаренко Н.В., Алесковский В.Б. Успехи химии, 51, 713 (1982).
4. Минц Р.И., Скопинов С.А., Яковлева С.В. Письма в ЖТФ, 14, 1850 (1988).
5. Захаров С.Д. и др. В сб.: Действие электромагнитного излучения на биологические объекты и лазерная медицина. Владивосток, изд. ДВО АН СССР, 1989, с. 38.
6. D o g e J. Physics World, 1, 25 (1988).
7. Борн М., Вольф Э. Основы оптики, М., Наука, 1973.
8. Захаров С.Д. и др. Краткие сообщения по физике ФИАН, №3, 12 (1990).
9. L o n g C., K e r n D. J. Chem. Phys., 59, 5729 (1973).
10. Захаров С.Д. и др. Изв. АН СССР, сер. физ., 54, №8, 1629 (1990).
11. D e l G i u d i c e E., P r e p a t a G., V i t i e l l o G. Phys. Rev. Lett., 61, 1085 (1988).
12. W a t e r. A comprehensive treatise, ed. Franks F., Plenum, New York, 1972-1982, 7 Vols.
13. S t a n l e y H. E. et al. Physica (Amsterdam), 106A, 260 (1981).
14. C l e m e n t i E. In: Structure and dynamics of nucleic acids, proteins and membranes. Eds. E. Clementi, S. Chin, Plenum, New York, 1986.
15. Бульенков Н.А. Кристаллография, 33, 424 (1988).

Поступила в редакцию 21 мая 1990 г.

После переработки 20 октября 1990 г.