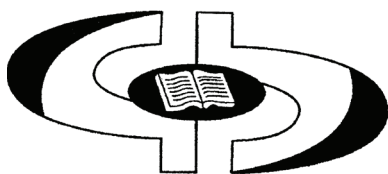


Научно-теоретический и информационно-методический журнал
Белорусского республиканского фонда
фундаментальных исследований

Издается с III квартала 1997 г.



№ 3 [69], 2014

Зарегистрирован
в Министерстве информации
Республики Беларусь,
свидетельство о регистрации
№ 426 от 29.05.2009

Учредители:
Национальная академия
наук Беларуси,
Белорусский
республиканский
фонд
фундаментальных
исследований

220072, г. Минск,
пр. Независимости, 66;
тел. 284-07-42,
284-25-08

Издатель:
РУП «Издательский дом
«Беларуская навука»

**ВЕСТНИК
ФОНДА
ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ
ИССЛЕДОВАНИЙ**

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Главный редактор
В. А. Орлович

Заместитель главного редактора
А. И. Лесникович

Ответственный секретарь
Н. Н. Костюкович

Члены редколлегии:

О. В. Алейникова	А. И. Локотко
А. В. Бильдюкевич	А. А. Лукашанец
П. А. Витязь	А. А. Махнач
И. В. Гайшун	А. Г. Мрочек
С. В. Гапоненко	В. И. Недилько
М. Л. Герман	П. Г. Никитенко
В. С. Камышников	В. И. Поткин
А. К. Карабанов	Л. М. Томильчик
А. В. Кильчевский	А. В. Тузиков
Э. И. Коломиец	В. С. Улащик
А. А. Коваленя	Ю. С. Харин
Н. П. Крутько	Л. В. Хотылева
Н. А. Ламан	С. Н. Черенкевич
В. Ф. Логинов	

Минск, 2014

СОДЕРЖАНИЕ

КОНКУРСЫ БРФФИ: НОРМАТИВНАЯ БАЗА

Условия республиканского тематического конкурса проектов фундаментальных научных исследований Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований «Наука-2015»	5
---	---

НАУЧНЫЕ ПУБЛИКАЦИИ

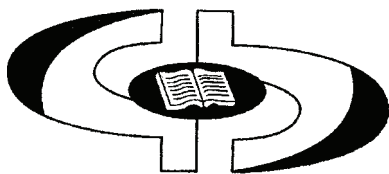
Астафьева Л. Г., Леднева Г. П., Pham Hong Minh. Преобразование оптического излучения наночастицами при изменении их структуры и состава	11
Асимов М. М., Асимов Р. М., Рубинов А. Н. Биомедицинское применение лазерно-индуцированной фотодиссоциации оксимиоглобина мышечной ткани	23
Козел Н. В., Ракович В. А., Серебrenникова О. В., Стрельникова Е. Б., Гулая Е. В., Аверина Н. Г. Растительные пигменты торфа как индикатор функционального состояния болотных экосистем Беларуси и Западной Сибири	31
Павлющик Е. А., Жукова И. А., Дорофеенко И. С., Чукарина Т. В., Афонин В. Ю. Влияние генетических и средовых факторов на показатели крови в условиях наследственной предрасположенности к артериальной гипертензии	42
Салем А. Э., Шолух М. В. Взаимодействие митохондриальной аспаргат аминотрансферазы с наночастицами коллоидного золота	56
Егоров А. С., Егорова В. П., Крот В. И., Крылова Г. В., Лахвич Ф. Ф., Липневич И. В., Ореховская Т. И., Велигура А. А., Говоров М. И., Шулицкий Б. Г., Улащик В. С. Электрохимическое и электрофоретическое детектирование гибридизации на комплексах ДНК/углеродные нанотрубки: SNP-генотипирование	63

НАУЧНЫЕ ОБЗОРЫ

Лобко А. С. Лазерно-плазменное ускорение заряженных частиц: принципы и достижения.....	88
---	----

The scientific-theoretical and information-methodical journal
of the Belarusian Republican Foundation
for Fundamental Research

Issued since the 3rd quarter of 1997



N 3 [69], 2014

Registered in
The Ministry of Information
of the Republic of Belarus,
Certificate
№ 426 of May 29, 2009

The founders:
The National Academy
of Sciences of Belarus,
The Belarusian
Republican
Foundation
for Fundamental
Research

220072, Minsk,
Independence Av., 66;
ph. 284-07-42,
284-25-08

The publisher:
RUE «Publishing House
«Belaruskaya navuka»

**VESTNIK
OF THE FOUNDATION
FOR FUNDAMENTAL
RESEARCH**

EDITORIAL BOARD:

Editor-in-Chief

V. A. Orlovich

Deputy Editors-in-Chief

A. I. Lesnikovich

Executive Secretary

N. N. Kostyukovich

Editorial board members:

O. V. Aleinikova	A. I. Lokotko
A. V. Bilyukevich	A. A. Lukashanets
P. A. Vityaz	A. A. Makhnach
I. V. Gaishun	A. G. Mrochek
S. V. Gaponenko	V. I. Nedilko
M. L. German	P. G. Nikitenko
V. S. Kamyshnikov	V. I. Potkin
A. K. Karabanov	L. M. Tomilchik
A. V. Kilchevsky	A. V. Tuzikov
E. I. Kolomiets	V. S. Ulashchik
A. A. Kovalenya	Yu. S. Kharin
N. P. Krut'ko	L. V. Khotylyova
N. A. Laman	S. N. Cherenkevich
V. F. Loginov	

Minsk, 2014

CONTENTS

BRFFR COMPETITIONS: NORMATIVE BASE

Terms of the BRFFR republican thematic competition «Science-2015» of proposals for fundamental scientific research projects.....	5
--	---

SCIENTIFIC PUBLICATIONS

Astafyeva L. G., Ledneva H. P., Pham Hong Minh. Transformation of optical radiation by nanoparticles under changes of their structure and composition	11
Asimov M. M., Asimov R. M., Rubinov A. N. Biomedical application of laser-induced photodissociation of muscle oxymyoglobin	23
Kozel N. V., Rakovich V. A., Serebrennikova O. V., Strelnikova E. B., Gulaya E. V., Averina N. G. Plant pigments of peat as an indicator of functional state of wetland ecosystems of Belarus and Western Siberia	31
Pavlyushchik O. O., Zhukova I. A., Darafeyenka I. S., Chukarina T. V., Afonin V. Yu. Influence of genetic and environmental factors on blood parameters under hereditary predisposition to arterial hypertension.....	42
Salem A. E., Sholukh M. V. Interaction of mitochondrial isoenzyme of aspartate aminotransferase with gold colloidal nanoparticles	56
Egorov A. S., Egorova V. P., Krot V. I., Krylova H. V., Lakhvich F. F., Lipnevich I. V., Orekhovskaya T. I., Veligura A. A., Govorov M. I., Shulitski B. G., Ulashchik V. S. Electrochemical and electrophoretic detection of hybridization on DNA/carbon nanotubes: SNP genetic typing.....	63

SCIENTIFIC REVIEWS

Lobko A. S. Laser plasma acceleration of charged particles: concepts and achievements	88
--	----

КОНКУРСЫ БРФФИ: НОРМАТИВНАЯ БАЗА

УТВЕРЖДЕНО
Протокол заседания
Бюро Научного совета БРФФИ
22 июля 2014 г. № 8

УСЛОВИЯ республиканского тематического конкурса проектов фундаментальных научных исследований Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований «Наука-2015»

Общие положения

1. Белорусский республиканский фонд фундаментальных исследований (далее – БРФФИ) объявляет республиканский тематический конкурс проектов фундаментальных научных исследований «Наука-2015» с целью финансовой поддержки творческих научных коллективов и отдельных ученых, занимающихся решением актуальных проблем по направлениям научных исследований, утвержденным постановлением Бюро Президиума НАН Беларуси от 14.07.2014 № 248, в рамках приоритетных направлений фундаментальных научных исследований в соответствии с перечнем, утвержденным постановлением Совета Министров Республики Беларусь от 19.04.2010 № 585.

2. Конкурс «Наука-2015» проводится по следующим научным направлениям:

а) в области физики, математики и информатики:

проблемы взаимодействий полей и излучений с микро- и макрообъектами, технологии на их основе;
динамические системы, процессы управления и методы обработки и анализа данных (модели и алгоритмы);

б) в области медико-фармацевтических наук:

фундаментальные основы разработок новых диагностических методов и фармацевтических средств для профилактики и лечения онкологических и нейродегенеративных заболеваний;

в) в области химии и наук о Земле:

комплексная переработка минерального сырья;

химия биологически активных соединений;

г) в области технических наук:

новые материалы, включая композиционные, адаптивные, наноструктурные: синтез и технологии обработки;

теплофизика, тепло- и массоперенос в сложных системах и средах, гидро- и газодинамика;

д) в области аграрно-биологических наук:

геномные агробιοтехнологии;

сохранение и изучение биоразнообразия;

сохранение плодородия почв;

е) в области общественных и гуманитарных наук:

стратегия обеспечения суверенитета Республики Беларусь;

70-летие Великой Победы (1945–2015 гг.): история и современность.

3. На конкурс принимаются заявки ученых, проживающих в Республике Беларусь и работающих в организациях, являющихся резидентами Республики Беларусь. Заявки представляются на русском или белорусском языке.

4. По результатам конкурса осуществляется целевое финансирование проектов фундаментальных научных исследований, прошедших отбор в экспертных советах и секциях Научного совета БРФФИ на основе заключений независимых экспертов и принятых к финансированию Научным советом БРФФИ*.

Одно и то же лицо может одновременно входить в состав исполнителей не более трех исследовательских проектов, включая как выполняемые проекты, так и заявляемые на конкурсы 2015 г. (на стадии подачи конкурсных материалов в БРФФИ). Не учитываются проекты, которые заканчиваются в 1 квартале 2015 г., а также проекты и заявки по конкурсам ГКНТ Республики Беларусь и НАН Беларуси.

При этом ученый может быть руководителем не более двух проектов, а в рамках одного вида конкурсов («Наука», «Наука М», «Наука МС», «БРФФИ–РФФИ» и др.) участвовать (в качестве как руководителя, так и исполнителя) не более, чем в одном проекте.

Заявки, поданные на конкурс с нарушением любого из вышеперечисленных ограничений, будут сняты с конкурса на стадии предварительной экспертизы экспертными советами.

5. Финансирование работ по проектам осуществляется на основе договоров между БРФФИ и организациями – исполнителями проектов за счет средств республиканского бюджета. Договор определяет стоимость НИР и порядок расчетов, сроки выполнения проекта, основные планируемые результаты и перечень научной продукции, предъявляемой по окончании работ, права сторон на результаты исследований и условия их коммерциализации, порядок приемки законченной НИР и отдельных ее этапов.

Приветствуется доленое участие в финансировании работ организаций – исполнителей проектов, а также заказчиков, заинтересованных в проведении фундаментальных исследований по конкретным научным направлениям.

* Возможны некоторые изменения в правилах принятия окончательного решения о выделении грантов с учетом Закона Республики Беларусь от 13 июля 2012 года «О государственных закупках товаров (работ, услуг)».

Необходимым условием предоставления грантов является обязательство ученых сделать результаты исследований общественным достоянием с опубликованием их в научных изданиях с указанием о поддержке БРФФИ. Публикации без таких ссылок не будут учитываться при приемке отчетов и оценке результатов исследований по проектам.

6. Гранты БРФФИ, по которым исполнители не заключили без уважительных причин договоры в течение двух месяцев со дня объявления итогов конкурса, отменяются.

Требования к проектам, представляемым на конкурс

7. На конкурс представляются проекты по направлениям фундаментальных научных исследований, приведенным в пункте 2 условий настоящего конкурса, способные внести существенный вклад в расширение и углубление научных знаний, отличающиеся новизной в постановке и методах проведения исследований и имеющие большую научную и практическую значимость.

8. При рассмотрении проектов оценивается:

актуальность тематики;

соответствие целей, задач и тематики проектов приоритетным направлениям фундаментальных научных исследований в соответствии с перечнем, утвержденным постановлением Совета Министров Республики Беларусь от 19.04.2010 № 585, а также мировым тенденциям развития науки;

наличие четко сформулированной и обоснованной научной идеи (гипотезы) проекта, степень ее оригинальности;

научная значимость запланированных результатов и возможность их практической реализации:

в виде экспериментальных образцов, прошедших испытания в производственных условиях, опытных образцов, опытных партий или промышленных серий в различного вида производствах;

при выполнении заданий государственных научно-технических программ или программ Союзного государства Беларуси и России;

в издании учебников и других учебных материалов в системе образования;

в патентах на изобретения, подтверждающих возможность их практической реализации;

в заключении контрактов с зарубежными организациями на выполнение работ по результатам фундаментальных исследований и выполнение международных проектов;

в использовании результатов НИР в материалах государственных органов Республики Беларусь;

соответствие программы исследования целям и задачам проекта, а также возможность достижения ожидаемых конечных результатов;

научная квалификация руководителя проекта и всего научного коллектива;

наличие необходимой материально-технической базы;
результативность предыдущих проектов по БРФФИ, выполненных под руководством данного ученого.

Преимущество отдается проектам, направленным на решение актуальных научных проблем по приоритетным направлениям научно-технического и социально-экономического развития Республики Беларусь, а также проектам, в состав исполнителей которых входят представители региональных научных организаций и/или отраслевых НИИ и КБ.

Руководитель проекта должен иметь не менее трех статей в авторитетных научных журналах и/или патентов на изобретения или монографию по научному направлению проекта и/или в смежных областях, опубликованных в течение последних трех лет (2012–2014 гг.).

9. Срок выполнения проекта, как правило, не должен превышать двух лет.

Дублирование плановой тематики научно-исследовательских работ не допускается.

Если в процессе конкурса исполнители получили по заявленной теме финансирование из другого источника, то они обязаны незамедлительно поставить БРФФИ об этом в известность. В противном случае заявка будет снята с конкурса (в случае получения гранта, он будет отменен), а исполнители лишены права участвовать во всех конкурсах БРФФИ в течение пяти лет.

Проекты, участвовавшие в предыдущих конкурсах БРФФИ, а также получившие ранее поддержку других фондов и организаций Республики Беларусь, к участию в конкурсе «Наука-2015» не допускаются.

10. Заявка на конкурс вносится по установленным формам в трех отдельно скрепленных экземплярах. В обязательном порядке представляется также электронный вариант заявочных материалов, сформированных в соответствии с инструкцией по составлению электронного варианта заявки. Заявитель несет ответственность, вплоть до снятия проекта с конкурса, за соответствие электронного варианта заявки заявке на бумажном носителе.

Материалы заявки должны включать:

титульный лист заявки (форма П1);

аннотацию (форма П2);

обоснование проекта (форма П3);

научную биографию руководителя проекта. Руководитель проекта должен указать суммарный индекс цитирования всех своих научных статей и индекс Хирша отдельно по каждой из нижеприведенных баз данных, а также привести перечень научных статей (не более 10 по выбору автора), имеющих наибольший индекс цитирования. Для получения информации о научном рейтинге необходимо использовать следующие базы данных:

1. Scopus (изд-во Elsevier);

2. Web of Science на платформе ISI Web of Knowledge;

3. Российский индекс научного цитирования (РИНЦ).

Доступ к первым двум базам данных предоставляется Центральной научной библиотекой им. Я. Коласа НАН Беларуси – единственным обладателем права доступа к этим ресурсам в Республике Беларусь (г. Минск, ул. Сурганова, 15, отдел электронных ресурсов, тел. для справок: (+37517) 294-91-89). Доступ к РИНЦ предоставляется Научной электронной библиотекой <http://elibrary.ru> в системе Science Index (http://elibrary.ru/projects/science_index/author_tutorial.asp) (форма П4);

калькуляцию сметной стоимости проекта (форма П5) с расшифровкой статей затрат, при этом количество штатных единиц не должно превышать пяти. Командировки планируются в пределах СНГ, затраты по соответствующей статье не должны превышать 20 % от плановой стоимости проекта. Приобретение оборудования не финансируется. Если в процессе выполнения проекта возникнет острая необходимость в приобретении научного оборудования, решение по данному вопросу принимается бюро Научного совета БРФФИ по ходатайству организации-исполнителя с подробным обоснованием такой необходимости. При этом расходы на эти цели не должны превышать 10 % от плановой себестоимости проекта. При наличии организаций-соисполнителей представляется лист согласования расходов, ограничение на количество штатных единиц в этом случае сохраняется;

перечень научных трудов руководителя проекта по научному направлению проекта и/или в смежных областях (до 10 наименований), опубликованных в течение последних трех лет (2012–2014 гг.) (форма П6).

При оформлении конкурсных материалов не допускаются изменения и дополнения в формах П1–П6. Все пояснения и сноски в формах должны быть сохранены, информация, где это необходимо, представляется в соответствии с указанными шаблонами.

При представлении заявок на исследования, требующие использования дорогостоящей инфраструктуры (сложных приборов коллективного пользования и др.) и дорогостоящих образцов, добытых в рамках других программ и проектов (образцов горных пород, биологических образцов и препаратов и др.), авторам необходимо приложить письменное согласие руководителей соответствующих организаций на доступ к такой инфраструктуре и образцам.

Авторам предоставляется право указывать нежелательных экспертов (но не организации) по своему проекту. Информация об этом приводится на отдельном листе, который прилагается к материалам заявки.

БРФФИ воздерживается от рекомендаций по изменению или дополнению формулировок в материалах заявок, представленных на конкурс, по существу их содержания. По принятым к финансированию проектам секции Научного совета БРФФИ имеют право вносить предложения по изменению названий проектов и уточнению отдельных их положений.

К материалам заявки прилагаются в двух экземплярах копии опубликованных научных трудов по тематике проекта и/или в смежных областях (до 5 наименований), которые скрепляются со 2-м и 3-м экземплярами заявки.

Сроки и условия участия в конкурсе

11. Заявки на конкурс представляются в объявленный срок. Для иногородних дата определяется по штемпелю на почтовом отправлении.

Заявки, оформленные с отклонениями от правил или представленные после объявленного срока, к конкурсу не допускаются. Не допускаются последующие замены страниц и изменения в тексте поданного проекта.

Информация о поступлении в БРФФИ и регистрации заявок выдается авторам по их запросу.

12. БРФФИ сообщает только окончательные результаты конкурса, информируя руководителей проектов, получивших гранты, в течение месяца после его завершения и публикуя списки поддержанных проектов в журнале «Вестник Фонда фундаментальных исследований» и на веб-сайте БРФФИ.

Апелляции на решения Научного совета и рабочих органов БРФФИ не принимаются и не рассматриваются. Информация о ходе рассмотрения заявок, включая рецензии на них, является конфиденциальной.

Представленные на конкурс материалы не возвращаются.

13. Материалы на конкурс направляются в исполнительную дирекцию Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований по адресу: 220072, г. Минск, пр. Независимости, 66, к. 101. Тел. для справок: 294-92-16 (физика, математика и информатика), 284-27-22 (технические науки), 294-93-36 (химия и науки о Земле, медико-фармацевтические науки), 294-92-17 (аграрно-биологические науки), 284-06-38 (общественные и гуманитарные науки), 294-93-35 (бухгалтерия). Факс: 284-08-97.

Условия конкурса и формы заявочных материалов могут быть скопированы на электронный носитель в исполнительной дирекции БРФФИ или с веб-сайта БРФФИ <http://fond.bas-net.by> в разделе «Объявленные конкурсы».

НАУЧНЫЕ ПУБЛИКАЦИИ

УДК 538.958+535.43

Л. Г. АСТАФЬЕВА¹, Г. П. ЛЕДНЕВА¹, PHAM HONG MINH²

ПРЕОБРАЗОВАНИЕ ОПТИЧЕСКОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НАНОЧАСТИЦАМИ ПРИ ИЗМЕНЕНИИ ИХ СТРУКТУРЫ И СОСТАВА

¹Институт физики имени Б. И. Степанова НАН Беларуси

²Институт физики ВАНТ (Вьетнам)

(Поступила в редакцию 26.08.2014)

На основании теоретической модели преобразования электромагнитного поля в двухслойных наночастицах сферической симметрии выявлены закономерности смещения плазмонных резонансов и изменения рассеяния, поглощения, ослабления и внутренних электромагнитных полей наночастиц в зависимости от их размеров, оптических констант ядра и оболочки, длины волны падающего излучения. В работе рассмотрены двухслойные сферические наночастицы: с ядром из золота и оболочкой из кварца и, наоборот, с ядром из кварца и оболочкой из золота. Установлено, что при увеличении толщины кварцевой оболочки на золотом ядре наночастицы увеличение длины волны плазмонного резонанса не превышает 8–10 нм относительно длины волны плазмонного резонанса золотой наночастицы. При этом максимальные значения эффективных поперечных сечений поглощения, рассеяния и ослабления двухслойных наночастиц возрастают на 30–40 % относительно соответствующих характеристик для случая золотой наночастицы. Показано, что максимумы в поглощении, рассеянии и ослаблении двухслойными наночастицами с кварцевыми ядрами и золотыми оболочками при увеличении толщины оболочки сдвигаются в сторону больших длин волн более чем на 100 нм по отношению к однородной частице золота. Полученные результаты позволяют сделать оценку оптических свойств наночастиц различной морфологии для оптимального выбора их в зависимости от потребностей практики.

Введение. Последнее десятилетие отмечено бурным развитием нанотехнологий с применением физических (в том числе лазерных) и химических методов. В настоящее время известно, что перевод материала в наноразмерное состояние сопровождается фундаментальными изменениями практически всех его физико-химических свойств (оптических, механических, термодинамических, каталити-

ческих и т. д.). Металлические наночастицы обладают рядом уникальных свойств, особенно, если размеры наночастиц меньше 100 нм. На оптические, термодинамические, механические свойства наночастиц существенное влияние оказывают эффекты пространственного ограничения элементарных носителей возбуждений, что приводит к проявлению плазмонных резонансов. Этот эффект отмечается для частиц с диаметром меньше длины волны падающего света [1].

Процессы взаимодействия лазерного излучения с наночастицами серебра экспериментально исследовались с 1998 г., начиная с пионерских работ [2–5]. Ряд характеристик наночастиц, в том числе параметры фрагментации наночастиц серебра под действием фемтосекундных лазерных импульсов, были экспериментально исследованы в [6; 7]. Наночастицы серебра использовались в системах создания изображений [8]. Металлические (золотые, серебряные и другие) наночастицы исследуются с целью использования в ряде применений в медицинской и биологической практике, в частности, для детектирования биомолекул и как биологические маркеры и сенсоры [9].

Новый метод селективного воздействия короткого лазерного импульса на биоклетки, внутрь которых были помещены наночастицы из золота или серебра, был предложен в [10; 11]. Значительные перспективы связываются с использованием данного метода в онкологии для селективного воздействия именно на раковые клетки [12]. Кроме того, частицы серебра обладают собственным бактерицидным действием [13].

Наночастицы из благородных металлов, в частности золота, имеют большой потенциал для их использования при диагностировании и терапии рака с учетом поверхностного плазмонного резонанса, усиливающего поглощение и рассеяние света. Изменяя состав наночастиц, можно переместить область локализации поверхностного плазмонного резонанса в ИК область спектра, например, используя двухслойные наночастицы, состоящие из кварцевой оболочки и золотого ядра [14]. Оптические свойства и угловое распределение интенсивности рассеянного света было исследовано в [15; 16] на примере многослойной наночастицы-матрешки, состоящей из трех слоев: ядро – золото, первая оболочка – кварц, вторая оболочка – золото. Наличие тонкой оболочки из кварца приводит к смещению плазмонного резонанса в ИК область спектра. Многослойная наночастица обеспечивает также увеличение обратного рассеяния при тех длинах волн, где двухслойная наночастица из кварцевого ядра и золотой оболочки рассеивает излучение, в основном, вперед в направлении падающего излучения.

Результаты теоретического изучения углового распределения интенсивности рассеяния света и эффективности рассеяния наночастицами золота и двухслойными наночастицами, состоящими из золотого ядра и кварцевой оболочки, при изменении радиусов наночастиц золота от 30 до 130 нм и изменении радиусов ядер и толщин оболочек двухслойных наночастиц [17] подтвердили необходимость использования двухслойных наночастиц при создании устройств с регулируемой эффективностью рассеяния света.

Отмеченные выше работы представляют достаточно разрозненные экспериментальные и теоретические результаты. В некоторых случаях полученные ре-

зультаты в этой области противоречивы и зачастую не имеют удовлетворительной физической интерпретации. Такое положение вещей связано в ряде случаев с отсутствием до настоящего времени систематических сравнительных исследований с использованием экспериментальных и теоретических методов.

Цель работы – теоретическое исследование влияния морфологии двухслойных наночастиц на преобразование оптического излучения через характеристики внешнего поля (эффективные поперечные сечения поглощения σ_{abs} , рассеяния σ_{sca} и ослабления σ_{ext}) и характеристики внутреннего поля (максимальные значения интенсивностей в распределении энергии внутри наночастиц I/I_0).

Теоретическая модель. Наночастицы моделируются сферическими частицами различной морфологии и состава при расчете рассеяния, поглощения, ослабления и внутренних электромагнитных полей наночастиц. Наночастицы как двухслойные сферы состоят из сферических ядер с радиусом r_0 и комплексным показателем преломления $m_0 = n_0 - ik_0$ и наружных сферических концентрических оболочек толщиной $\Delta r = r_1 - r_0$, где r_1 – внешний радиус частицы, с комплексным показателем преломления $m_1 = n_1 - ik_1$. Наночастицы располагаются в однородной непоглощающей среде с показателем преломления n_m . Выражения для характеристик светорассеяния сферической наночастицы (факторы эффективности поглощения K_{abs} , рассеяния K_{sca} и ослабления K_{ext}) можно записать через амплитудные коэффициенты, получаемые из теории дифракции электромагнитного излучения на многослойной сфере [18; 19]. Поперечные сечения поглощения, рассеяния и ослабления σ_{abs} ($\sigma_{\text{abs}} = \pi r_1^2 K_{\text{abs}}$), σ_{sca} ($\sigma_{\text{sca}} = \pi r_1^2 K_{\text{sca}}$) и σ_{ext} ($\sigma_{\text{ext}} = \pi r_1^2 K_{\text{ext}}$) выражаются через K_{abs} , K_{sca} , K_{ext} , которые имеют следующий вид:

$$K_{\text{ext}} = \frac{2}{\rho_1^2} \text{Im} \sum_{l=1}^{\infty} i(2l+1)(a_l + b_l),$$

$$K_{\text{sca}} = \frac{2}{\rho_1^2} \sum_{l=1}^{\infty} (2l+1) (|a_l|^2 + |b_l|^2),$$

$$K_{\text{abs}} = K_{\text{ext}} - K_{\text{sca}},$$

где a_l и b_l – амплитудные коэффициенты для двухслойной сферической частицы; $\rho_1 = 2\pi r_1 / \lambda$ – безразмерный параметр частицы. Эти коэффициенты имеют следующий вид:

$$a_l = \frac{\Psi_l(m_1 \rho_0) \xi_l(m_1 \rho_1) N_1 N_5 - N_2 N_6}{\xi_l(n_m \rho_1) \frac{\Psi_l(m_1 \rho_1) \xi_l(m_1 \rho_0)}{\Psi_l(m_1 \rho_0) \xi_l(m_1 \rho_1)} N_1 N_4 - N_2 N_3},$$

$$b_l = \frac{\Psi_l(n_m \rho_1) \frac{\Psi_l(m_1 \rho_0) \xi_l(m_1 \rho_1)}{\Psi_l(m_1 \rho_1) \xi_l(m_1 \rho_0)} \bar{N}_1 \bar{N}_5 - \bar{N}_2 \bar{N}_6}{\xi_l(n_m \rho_1) \frac{\Psi_l(m_1 \rho_0) \xi_l(m_1 \rho_1)}{\Psi_l(m_1 \rho_1) \xi_l(m_1 \rho_0)} \bar{N}_1 \bar{N}_4 - \bar{N}_2 \bar{N}_3},$$

$$\begin{aligned}
 N_1 &= D_l(m_1\rho_0) - m_{01}D_l(m_0\rho_0), \\
 N_2 &= G_l(m_1\rho_0) - m_{01}D_l(m_0\rho_0), \\
 N_3 &= G_l(m_2\rho_1) - m_{12}D_l(m_1\rho_1), \\
 N_4 &= G_l(n_m\rho_1) - m_{12}D_l(m_1\rho_1), \\
 N_5 &= D_l(n_m\rho_1) - m_{12}G_l(m_1\rho_1), \\
 N_6 &= D_l(n_m\rho_1) - m_{12}D_l(m_1\rho_1),
 \end{aligned}$$

где $m_{01} = m_0 / m_1$, $m_{12} = m_1 / n_m$. Выражения для $\bar{N}_1, \bar{N}_2, \bar{N}_3, \bar{N}_4, \bar{N}_5, \bar{N}_6$ получают-ся из выражений $N_1, N_2, N_3, N_4, N_5, N_6$ заменой m_{ij} на m_{ji} ; $\psi_l(z)$ – функция Риккати–Бесселя; ζ_l – функция Риккати–Ханкеля; $D_l(z) = \psi'_l / \psi_l(z)$ – логарифмическая производная функции Риккати–Бесселя; $G_l(z) = \xi'_l(z) / \xi_l(z)$ – логарифмическая производная функции Риккати–Ханкеля. Угловая структура рассеянного излучения для двухслойной сферической частицы (оптическая индикатриса или интенсивность) I_{sca} описывается следующими выражениями:

$$\begin{aligned}
 i_1(\theta) &= \left| \sum_{l=1}^{\infty} a_l \tau_l(\cos \theta) + b_l \pi_l(\cos \theta) \right|^2 \sin^2 \phi, \\
 i_2(\theta) &= \left| \sum_{l=1}^{\infty} a_l \tau_l(\cos \theta) + b_l \pi_l(\cos \theta) \right|^2 \cos^2 \phi, \\
 I_{\text{sca}} &= \frac{i_1 + i_2}{2}, \\
 \pi_l(\cos \theta) &= P_l^{(1)}(\cos \theta) \sin \theta, \\
 \tau_l(\cos \theta) &= \frac{dP_l^{(1)}(\cos \theta)}{d\theta},
 \end{aligned}$$

где $P_l^{(1)}(\cos \theta)$ – полином Лежандра первого порядка степени n с действительным аргументом $\cos \theta$. Угол θ связан с углом рассеяния β соотношением $\beta = 180^\circ - \theta$. В задачах, связанных со сферической симметрией, появляются полиномы только первого порядка.

Компоненты электрического поля в данной точке внутри слоев двухслойной наносферы могут быть также получены из теории дифракции электромагнитного излучения на многослойной сфере. Эти компоненты электрического поля в данной точке внутри ядра можно записать следующим образом:

$$E_r^{(1)} = (m_0 k_0 r)^{-2} \cos \phi \sum_{l=1}^{\infty} l(l+1) \frac{\psi_l(m_0 k_0 r)}{\psi_l(m_0 k_0 r_0)} A_l^{(1)} Q_l(\theta) \sin(\theta), \quad (1)$$

$$E_\theta^{(1)} = (m_0 k_0 r)^{-1} \cos \phi \sum_{l=1}^{\infty} \frac{\psi_l(m_0 k_0 r)}{\psi_l(m_0 k_0 r_0)} \left[A_l^{(1)} D_l(m_0 k_0 r) S_l(\theta) + i B_l^{(1)} Q_l(\theta) \right]. \quad (2)$$

Выражения для компонент электрического поля внутри оболочки имеют вид:

$$E_r^{(2)} = (m_1 k_0 r)^{-2} \cos \phi \sum_{l=1}^{\infty} l(l+1) \left[\frac{\psi_l(m_1 k_0 r)}{\psi_l(m_1 k_0 r_1)} A_l^{(2)} + \frac{\xi_l(m_1 k_0 r)}{\xi_l(m_1 k_0 r_1)} \tilde{A}_l^{(2)} \right] \times Q_l(\theta) \sin(\theta), \quad (3)$$

$$E_{\theta}^{(2)} = (m_1 k_0 r)^{-1} \cos \phi \sum_{l=1}^{\infty} \left[\frac{\psi_l(m_1 k_0 r)}{\psi_l(m_1 k_0 r_1)} A_l^{(2)} D_l(N_2 k_0 r) + \frac{\xi_l(m_1 k_0 r)}{\xi_l(m_1 k_0 r_1)} \tilde{A}_l^{(2)} \right] S_l(\theta) + i \left[\frac{\psi_l(m_1 k_0 r)}{\psi_l(m_1 k_0 r_1)} B_l^{(2)} + \frac{\xi_l(m_1 k_0 r)}{\xi_l(m_1 k_0 r_1)} \tilde{B}_l^{(2)} \right] Q_l(\theta). \quad (4)$$

В уравнениях (1)–(4) k_0 – волновое число в вакууме ($k_0 = 2\pi / \lambda$, λ – длина волны лазерного излучения); индекс 1 соответствует ядру с радиусом r_0 ($0 < r < r_0$), индекс 2 относится к внешней оболочке ($r_0 < r < r_1$), $m_0 = n_0 - ik_0$ – комплексный показатель преломления вещества ядра в случае $i = 1$ и $m_1 = n_1 - ik_1$ – комплексный показатель преломления вещества оболочки при $i = 2$. Угловые функции $Q_l(\theta)$ и $S_l(\theta)$ определяются с помощью полиномов Лежандра $P_l^{(1)}(\cos(\theta))$ и их производных. Коэффициенты $A_l^{(i)}$, $B_l^{(i)}$ и $\tilde{A}_l^{(i)}$, $\tilde{B}_l^{(i)}$ в уравнениях (1)–(4) имеют вид

$$A_l^{(1)} = i^{l-1} \frac{2l+1}{l(l+1)} \frac{m_0}{n_m} \frac{1}{\psi_l(m_1 k_0 r_1) \xi_l(m_1 k_0 r_0)} \frac{1}{\xi_l(n_m k_0 r_1)} \frac{1}{\Delta_1},$$

$$B_l^{(1)} = i^{l-1} \frac{2l+1}{l(l+1)} \frac{1}{\psi_l(m_1 k_0 r_1) \xi_l(m_1 k_0 r_0)} \frac{1}{\xi_l(n_m k_0 r_1)} \frac{1}{\Delta_2},$$

$$A_l^{(2)} = i^l \frac{2l+1}{l(l+1)} \frac{m_0}{n_m} \frac{1}{\psi_l(n_m k_0 r_1)} \frac{\tilde{L}}{\Delta_2}, \tilde{A}_l^{(2)} = (-i)^l \frac{2l+1}{l(l+1)} \frac{\psi_l(m_1 k_0 r_0)}{\psi_l(m_1 k_0 r_1)} \frac{1}{\xi_l(n_m k_0 r_1)} \frac{\tilde{M}}{\Delta_1},$$

$$B_l^{(2)} = i^l \frac{2l+1}{l(l+1)} \frac{m_1}{n_m} \frac{1}{\xi_l(n_m k_0 r_1)} \frac{L}{\Delta_1}, \tilde{B}_l^{(2)} = (-i)^l \frac{2l+1}{l(l+1)} \frac{m_1}{n_n} \frac{\psi_l(m_1 k_0 r_0)}{\psi_l(m_1 k_0 r_1)} \frac{1}{\xi_l(n_m k_0 r_1)} \frac{M}{\Delta_2},$$

где

$$\Delta_1 = \frac{\psi_l(m_1 k_0 r_0)}{\psi_l(m_1 k_0 r_1)} \frac{\xi_l(m_1 k_0 r_1)}{\xi_l(m_1 k_0 r_0)} MH - LF,$$

$$\Delta_2 = \frac{\psi_l(m_1 k_0 r_0)}{\psi_l(m_1 k_0 r_1)} \frac{\xi_l(m_1 k_0 r_1)}{\xi_l(m_1 k_0 r_0)} \tilde{M}\tilde{H} - \tilde{L}\tilde{F},$$

где

$$F = G_l(n_m k_0 r_1) - m_{1m} D_l(m_1 k_0 r_1),$$

$$H = G_l(n_m k_0 r_1) - m_{1m} G_l(m_1 k_0 r_1),$$

$$L = G_l(m_1 k_0 r_0) - m_{01} D_l(m_0 k_0 r_0),$$

$$M = D(m_1 k_0 r_0) - m_{01} D_l(m_0 k_0 r_0),$$

$m_{1m} = m_1 / n_m$, $m_{01} = m_0 / m_1$. Выражения \tilde{F} , \tilde{H} , \tilde{L} , \tilde{M} могут быть получены из соответствующих выражений для F , H , L , M заменой N_{ij} на N_{ji} , где $N_{ij} = N_i / N_j$.

Таким образом, разработанная теоретическая модель преобразования электромагнитного поля в двухслойных наночастицах сферической симметрии позволяет моделировать рассеяние, поглощение, ослабление и внутренние электромагнитные поля наночастиц.

Результаты и их обсуждение. Рассмотрим двухслойные сферические наночастицы: с ядром из золота и оболочкой из кварца и, наоборот, с ядром из кварца и оболочкой из золота. Золото используется в качестве материала оболочек, поскольку оно обладает свойствами, подходящими для многих применений, и широко используется в эксперименте. Оптические свойства золота были взяты из [14], оптические свойства кварца – из [15].

Проведем анализ влияния толщины оболочки и размера ядра на спектральные зависимости эффективных поперечных сечений поглощения σ_{abs} (а), рассеяния σ_{sca} (б) и ослабления σ_{ext} (в) излучения двухслойными наночастицами.

Вначале рассмотрим характеристики двухслойных наночастиц с золотыми ядрами и кварцевыми оболочками. Рис. 1 представляет спектральные зависимости эффективных поперечных сечений поглощения σ_{abs} (а), рассеяния σ_{sca} (б)

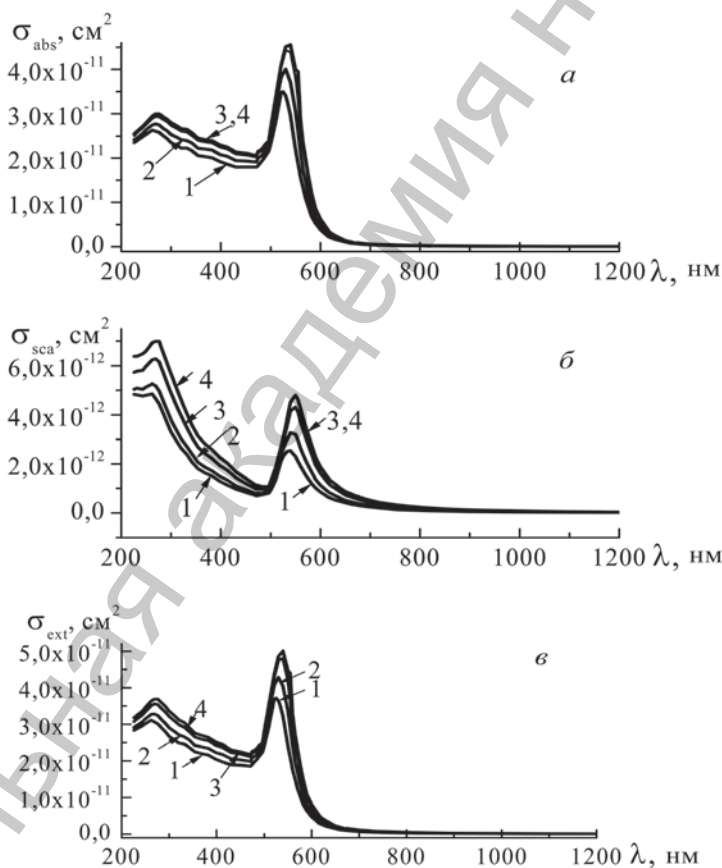


Рис. 1. Зависимости эффективных поперечных сечений поглощения σ_{abs} (а), рассеяния σ_{sca} (б) и ослабления σ_{ext} (в) однородной золотой наночастицы и двухслойных наночастиц с золотым ядром и кварцевыми оболочками, находящимися в воде, от длины волны. Радиусы ядер $r_0 = 20$ нм, толщины оболочек $\Delta r = 0$ нм (1), 5 нм (2), 15 нм (3) и 20 нм (4)

и ослабления σ_{ext} (в) излучения однородной наночастицей золота радиусом 20 нм и двухслойными наночастицами с золотыми ядрами радиусом 20 нм и кварцевыми оболочками с толщинами оболочек $\Delta r = 5, 15$ и 20 нм, находящимися в воде, в диапазоне $200 \leq \lambda \leq 1200$ нм.

Характер зависимостей поглощения, рассеяния и ослабления практически одинаков. В рассматриваемом диапазоне длин волн имеется два максимума в поглощении, рассеянии и ослаблении. Первый максимум располагается в ультрафиолетовой области спектра на длине волны примерно 270 нм и сдвигается по длинам волн в зависимости от толщины оболочки не существенно в пределах 5–7 нм. Второй максимум для поглощения и ослабления в 1,5 раза выше и сдвинут в сторону больших длин волн примерно на 260 нм, а для рассеяния второй максимум ниже первого в 1,6 раза и сдвинут по длинам волн на ~280 нм. Второй максимум находится в области плазмонного резонанса 532–540 нм в зависимости от толщины оболочек. Для однородной наночастицы золота второй максимум располагается примерно при 525–530 нм. В случае тонкой оболочки 5 нм плазмонный резонанс в поглощении находится в области 532 нм и превышает σ_{abs} золотой наночастицы в 1,2 раза. При увеличении толщины оболочки максимум сдвигается на 8–10 нм в область 540 нм и при $\Delta r = 20$ нм выше на 30–40 %, чем у золотой наночастицы. Появление кварцевой оболочки и увеличение ее толщины приводит к росту максимального значения эффективных поперечных сечений поглощения σ_{abs} (а), рассеяния σ_{sca} (б) и ослабления σ_{ext} (в) двухслойных наночастиц.

Иной характер носят спектральные зависимости эффективных поперечных сечений поглощения σ_{abs} (а), рассеяния σ_{sca} (б) и ослабления σ_{ext} (в) излучения двухслойными наночастицами с кварцевыми ядрами и золотыми оболочками. На рис. 2 представлены зависимо-

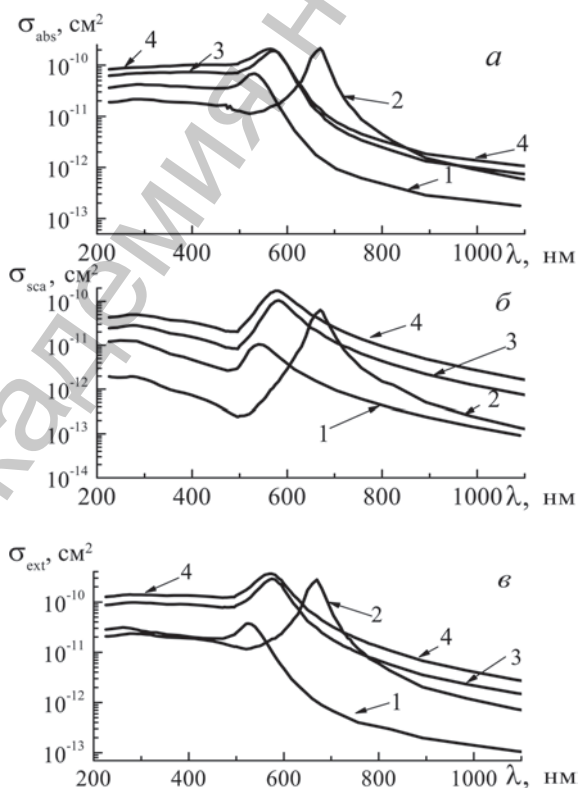


Рис. 2. Зависимости от длины волны эффективных поперечных сечений поглощения σ_{abs} (а), рассеяния σ_{sca} (б) и ослабления σ_{ext} (в): 1 – наночастица из золота, 2–4 – двухслойные наночастицы с кварцевым ядром и золотыми оболочками, находящимися в воде. Радиусы ядер $r_0 = 20$ нм, толщины оболочек $\Delta r = 0$ нм (1), 5 нм (2), 15 нм (3) и 20 нм (4)

сти $\sigma_{\text{abs}}(a)$, $\sigma_{\text{sca}}(b)$ и $\sigma_{\text{ext}}(e)$ для частиц радиусом ядра 20 нм и золотыми оболочками с толщинами оболочек $\Delta r = 5, 15$ и 20 нм, находящимися в воде, в диапазоне $200 \leq \lambda \leq 1200$ нм.

В отличие от рис. 1 максимумы в поглощении, рассеянии и ослаблении двухслойными наночастицами с кварцевыми ядрами и золотыми оболочками при увеличении толщины оболочки сначала сдвигаются в сторону больших длин волн по отношению к однородной частице золота. Дальнейший рост оболочки сопровождается обратным сдвигом расположения максимумов в сторону меньших длин волн, что приближает их к расположению максимума золотой наночастицы. Причем максимальные значения эффективных поперечных сечений двухслойных наночастиц в случае тонкой оболочки $\Delta r = 5$ нм резко возрастают в 6–10 раз относительно максимума для золотой наночастицы (кривая 1). При дальнейшем увеличении толщины оболочки от 5 до 20 нм максимумы эффективных поперечных сечений поглощения слабо изменяются, а эффективные поперечные сечения рассеяния и ослабления возрастают еще в 2,7 и 1,3 раза соответственно. Абсолютные значения эффективных поперечных сечений поглощения $\sigma_{\text{abs}}(a)$, рассеяния $\sigma_{\text{sca}}(b)$ и ослабления $\sigma_{\text{ext}}(e)$ излучения двухслойными наночастицами с кварцевыми ядрами радиусом 20 нм и золотыми оболочками в 5–7 раз превосходят аналогичные характеристики двухслойных наночастиц с золотыми ядрами радиусом 20 нм и кварцевыми оболочками.

Оптические свойства двухслойных наночастиц определяются характером распределения интенсивности их внутренних полей. Установлено, что обычно используемое электростатическое приближение, согласно которому поле внутри частицы можно считать однородным, в рассматриваемом случае не применимо. На рис. 3 приведены внутренние поля двухслойных наночастиц с кварцевым ядром и золотыми оболочками. Из рисунков видно, что поле в двухслойной частице является сильно неоднородным. Наибольшее значение интенсивности поля принимает в кварцевой оболочке вблизи границы с ядром, что обусловлено прозрачностью кварца и сильным поглощением золота. В случае тонких оболочек (рис. 3, а) интенсивность в оболочке уменьшается по направлению к границе двухслойной наночастицы примерно в 3,5 раза, при этом интенсивность в ядре изменяется слабо и имеет такие же значения, как и в однородном ядре с размером $r_0 = 20$ нм. В случае толстых оболочек (рис. 3, б) интенсивность в оболочке резко падает более чем в 20 раз по направлению к границе двухслойной наночастицы. В золотом ядре при этом значения интенсивности несколько выше, чем в однородной наночастице из золота аналогичного размера ($r_0 = 20$ нм), и мало изменяются. Величина интенсивности поля на границе ядра и оболочки может более чем в 5–7 раз превосходить поле в однородной наночастице золота. Однако при тонких кварцевых оболочках зависимость максимальной интенсивности поля в кварцевой оболочке с ростом радиуса ядра носит нелинейный характер, вначале интенсивность поля возрастает почти в 1,5 раза, а затем уменьшается. Одновременно при этом растет длина волны плазмонного резонанса.

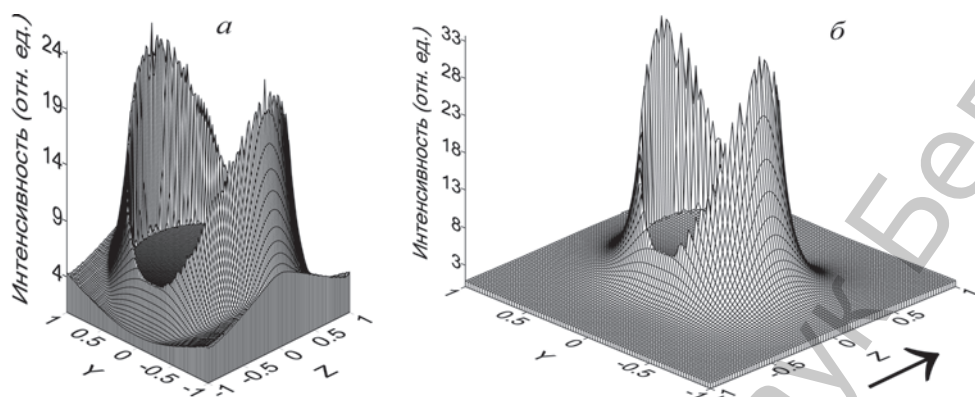


Рис. 3. Распределение интенсивности внутреннего поля в поперечном сечении сферических двухслойных наночастиц из золотого ядра и кварцевых оболочек. Радиусы ядер $r_0 = 20$ нм, толщины оболочек и длины волн плазмонных резонансов $\Delta r = 5$ нм, $\lambda = 545$ нм (а); $\Delta r = 30$ нм $\lambda = 550$ нм (б). Стрелки показывают направление распространения падающего излучения

Распределение интенсивности внутреннего поля в двухслойной наночастице с ядром из кварца и золотой оболочкой отличается от предыдущего случая. Ниже для сравнения на рис. 4 приведены распределения энергии внутри однородной наночастицы золота и двухслойных наночастиц с золотым ядром и кварцевой оболочкой и кварцевым ядром с золотой оболочкой в области плазменной частоты каждой из наночастиц. Действительно, из рис. 4 видно, что картины распределения энергии сильно различаются.

На рис. 4, а внутри однородной частицы золота распределение практически однородно с максимальным значением относительной интенсивности $I_{\max} \approx 5,05$. Область максимальных значений интенсивности располагается вблизи передней поверхности наночастицы, обращенной к падающему излучению. При образовании на поверхности золотого ядра кварцевой оболочки (рис. 4, б) распределение кардинально изменяется: I_{\max} увеличивается более чем в 5 раз, появляются две области максимальных значений в направлениях, перпендикулярных падающему излучению, положение плазмонного резонанса сдвигается с 532 на 550 нм. Что касается рис. 4, в, то здесь картина опять изменяется. Распределение энергии внутри наночастицы с кварцевым ядром и золотой оболочкой представляет существенное возвышение в области ядра с максимальным значением интенсивности $I_{\max} \approx 15,1$, плазменная частота располагается в области 570 нм. Таким образом, можно сделать вывод о том, что как характеристики внешних полей, так и характеристики внутренних полей существенно различаются для двухслойных наночастиц различного состава. Области максимумов поглощения и рассеяния не совпадают по спектру и по величине. Распределения энергии двухслойных наночастиц сильно отличаются величиной максимума энергии и местом локализации максимальной плотности энергии.

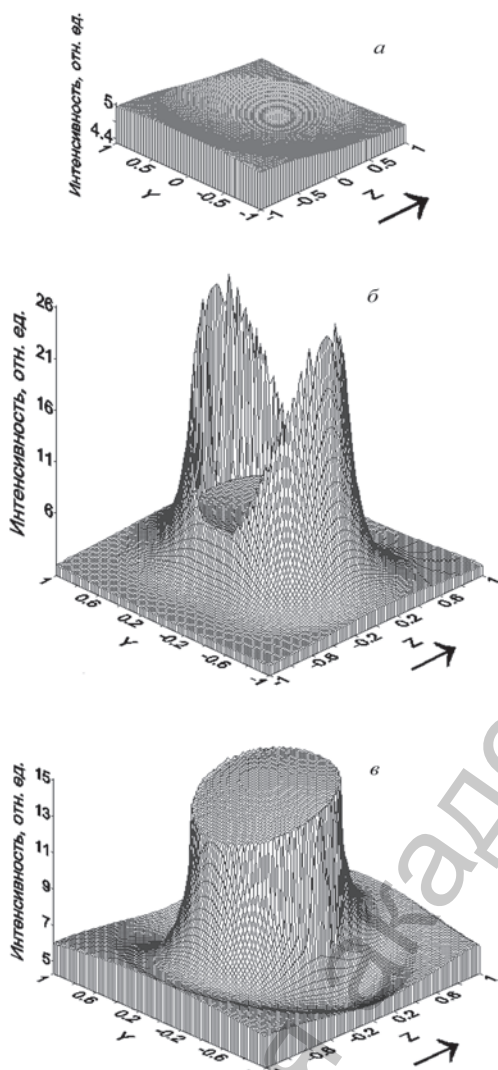


Рис. 4. Распределение интенсивности внутреннего поля в поперечном сечении однородной наночастицы золота (а), сферической двухслойной наночастицы из золотого ядра и кварцевой оболочки (б) и сферической двухслойной наночастицы из кварцевого ядра и золотой оболочки (в). Стрелки показывают направление распространения падающего излучения. $r_0 = 20$ нм для однородной наночастицы золота, $\lambda = 532$ нм (а), и $r_0 = 20$ нм, $r_1 = 40$ нм для двухслойных наночастиц, $\lambda = 550$ нм (б) и $\lambda = 570$ нм (в)

Заключение. На основании разработанной теоретической модели преобразования электромагнитного поля в двухслойных наночастицах сферической симметрии выявлены закономерности смещения плазмонных резонансов и изменения рассеяния, поглощения, ослабления и внутренних электромагнитных полей наночастиц в зависимости от их размеров, оптических констант ядра и оболочки, длины волны падающего излучения.

Установлено, что при увеличении толщины кварцевой оболочки на золотом ядре наночастицы рост длины волны ядра плазмонного резонанса не превышает 8–10 нм относительно длины волны плазмонного резонанса золотой наночастицы. При этом максимальные значения эффективных поперечных сечений поглощения, рассеяния и ослабления двухслойных наночастиц возрастают на 30–40 % относительно соответствующих характеристик для золотой наночастицы.

Установлено, что максимумы в поглощении, рассеянии и ослаблении двухслойными наночастицами с кварцевыми ядрами и золотыми оболочками при увеличении толщины оболочки сначала сдвигаются в сторону больших длин волн более чем на 100 нм по отношению к однородной частице золота, а дальнейший рост оболочки сопровождается обратным сдвигом расположения максимумов в сторону меньших длин волн, что приближает их к расположению максимума золотой наночастицы. Расчеты показали, что поле в двухслойной частице с золотым ядром и кварцевой оболочкой является сильно неоднородным.

Наибольшее значение интенсивность поля принимает в кварцевой оболочке вблизи границы с ядром, что обусловлено прозрачностью кварца и сильным поглощением золота. При тонких кварцевых оболочках зависимость максимальной интенсивности поля в кварцевой оболочке с ростом радиуса ядра носит нелинейный характер, вначале интенсивность поля возрастает почти в 1,5 раза, а затем уменьшается. Одновременно при этом растет длина волны плазмонного резонанса.

Таким образом, полученные результаты позволяют сделать оценку оптических свойств наночастиц различной морфологии для оптимального выбора их в зависимости от потребностей практики.

Исследования частично финансировались Белорусским республиканским фондом фундаментальных исследований (проект Ф12В-005).

Литература

1. *Kreibig U., Vollmer M.* Optical properties of metal clusters. Berlin: Springer, 1995. P. 184–187.
2. *Kamat P., Flumiani M., Hartland G.* // J. Phys. Chem. B. 1998. Vol. 102, N 17. P. 3123–3129.
3. *Takami A., Kurito H., Koda* // J. Phys. Chem. B. 1999. Vol. 103, N 8. P. 1226–1232.
4. *Link S., El-Sayed M. A.* // J. Phys. Chem. B. 1999. Vol. 103, N 40. P. 8410–8426.
5. *Ah C. S., Han H. S., Kim K., Jang D.-J.* // J. Phys. Chem. B. 2000. Vol. 104, N 34. P. 8153–8159.
6. *Burda C., Chen X., Narayanan R., El-Sayed M. A.* // Chem. Rev. 2005. Vol. 105, N 4. P. 1025–1102.
7. *Eustis S., Krylova G., Eremenko A.* et al. // Photochem. Photobiol. Sci. 2005. Vol. 4, N 1. P. 154–159.
8. *Lee K., El-Sayed M. A.* // J. Phys. Chem. B. 2006. Vol. 110, N 39. P. 19220–19225.
9. *Serra A., Filippo E., Re M., Palmisano M.* et al. // Nanotechnology. 2009. Vol. 20, N 16. P. 165501.
10. *Huttmann G., Radt B., Serbin J.* et al. // Med. Laser Applic. 2002. Vol. 17, N 1. P. 9–14.
11. *Pitsillides C. M., Joe E. K., Wei X., Anderson R. R.* // Biophys. J. 2003. Vol. 84, N 6. P. 4023–4032.
12. *Tripathy S.* // Nanoscale Res. Lett. 2008. Vol. 3, N 4. P. 164–167.
13. *Pal S., Tak Y. K., Song J. M.* // Appl. Environmental Microbiology. 2007. Vol. 73, N 6. P. 1712–1720.
14. *Jain Prashant K., El-Sayed Ivan H., El-Sayed Mostafa A.* // Nanotoday. 2007. Vol. 2, N 1. P. 18–29.
15. *Liaw Jiunn-Woei, Chen Huang-Chih, Kuo Mao-Kuen* // Nanoscale Research Letters. 2013. Vol. 8, N 1. P. 468–472.
16. *Hu Ying, Fleming Ryan C., Dzerek Rebekah A.* // Optics Express. 2008. Vol. 16, N 24. P. 19579–19591.
17. *Ruffino F., Pugliara A., Carria E.* et al. // Fisica E: Low-dimensional Systems and Nanostructures. 2013. Vol. 47, N 1. P. 25–33.
18. *Bohren C. F., Huffman D. R.* Absorption and scattering of light by small particles. New York, 1983. P. 227–243.
19. *Прищивалко А. П., Бабенко В. А., Кузьмин В. Н.* Рассеяние и поглощение света неоднородными и анизотропными сферическими частицами. Минск, 1984. С. 75–84.
20. *Johnson P. B., Christy R. W.* // Phys. Rev. B 1972. Vol. 6, N 12. P. 4370–4379.
21. *Malitson I. H.* // JOSA. 1965. Vol. 55, N 10. P. 1205–1209.

L. G. ASTAFYEVA, H. P. LEDNEVA, PHAM HONG MINH

**TRANSFORMATION OF OPTICAL RADIATION BY NANOPARTICLES
UNDER CHANGES OF THEIR STRUCTURE AND COMPOSITION**

Summary

The regularities of plasmonic resonance shifting and change of absorption, scattering, extinction and internal electromagnetic fields in nanoparticles in the dependence of their sizes, optical constants of core and shell, wavelength of incident radiation are revealed on the basis of theoretical model of transformation of an electromagnetic fields in two-layered nanoparticles of spherical symmetry. Two-layered spherical nanoparticles with gold core and silica shell and vice versa with silica core and gold shell are considered. It is determined that with increasing silica shell thickness on gold core of nanoparticle the rise of plasmonic resonance wavelength doesn't exceed $8\div 10$ nm in relative to plasmonic resonance wavelength of the gold nanoparticle. In this case maximal values of efficiency cross-sections of absorption, scattering, extinction of two-layered nanoparticles are increased by 30–40 % in relative to gold nanoparticle. It is shown that maxima in absorption, scattering, extinction of two-layered nanoparticles with silica core and gold shell are shifted more than 100 nm in the direction of longer wavelength with increasing silica shell thickness in relative to gold nanoparticle. These results lead to give estimation of optical properties of nanoparticles of different morphology for their optimal choice in the dependence of practical needs.

УДК 621.373.8;004.14

М. М. АСИМОВ¹, Р. М. АСИМОВ², А. Н. РУБИНОВ¹**БИМЕДИЦИНСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ
ЛАЗЕРНО-ИНДУЦИРОВАННОЙ ФОТОДИССОЦИИ
ОКСИМИОГЛОБИНА МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ**¹Институт физики им. Б. И. Степанова НАН Беларуси²ООО «Сенсоэлектроника», Парк высоких технологий, Минск

(Поступила в редакцию 27.08.2014)

В работе представлены результаты исследований лазерно-индуцированной фотодиссоциации оксимиоглобина (MbO_2) мышечной ткани и ее роли в процессе газообмена в организме человека. Показано, что фотодиссоциация MbO_2 позволяет регулировать концентрацию кислорода в мышечных тканях, непосредственно в зоне воздействия лазерным излучением. Рассмотрены критерии эффективности оксигенации мышечной ткани при комбинированном воздействии лазерным излучением на двух длинах волн. Полученные результаты могут быть использованы в современной медицине для предотвращения мышечной атрофии у малоподвижных больных и инвалидов.

Введение. Физика взаимодействия лазерного излучения с биотканью и особенно исследование влияния лазерного излучения на фотофизические свойства гемоглобина (Hb) и оксигемоглобина (HbO_2) крови *in vivo* представляет практический интерес для фотобиологии и фотомедицины. Этот интерес обусловлен широким использованием лазерного излучения в терапии различных патологий, включая раковые опухоли. Лазерная терапия – интенсивно развивающаяся на протяжении последних 50 лет область современной медицины [1–4].

Развитие лазерной физики в 1960-е годы явилось ключевым фактором в интенсивном формировании и становлении новых направлений в науке. Такие направления, как нелинейная оптика, селективная лазерная спектроскопия, кинетическая лазерная спектроскопия, а также применение лазеров в науках о жизни, сформировались именно в этот период. Во всех этих направлениях ключевую роль играют лазеры как новые источники света с высокой степенью когерентности, направленности и монохроматичности выходного излучения.

Одним из социально значимых явлений стало использование лазеров в биологии и медицине. Взаимодействие лазерного излучения с биологической тканью

определило два основных направления исследований по изучению механизма воздействия лазерного излучения на биоткань: термический – при воздействии излучением лазера с высокой выходной энергией, и нетермический – при воздействии лазером с низкой интенсивностью излучения.

Механизм взаимодействия лазера с высокой выходной энергией с биологической тканью основан на фототермолизе – преобразовании падающего излучения в тепло, локальном разогреве и денатурации белка в зоне воздействия. Тепловое преобразование световой энергии лазера открыло новые горизонты, прежде всего в хирургии, офтальмологии и дерматологии (косметологии).

Сложнее обстоял вопрос с выяснением механизма биостимулирующего и терапевтического действия низкоинтенсивного лазерного излучения. Воздействие излучением гелий-неонового (He-Ne) лазера не вызывало термических изменений, и поэтому казалось, что оно не поглощается никакой компонентой биоткани. Тем не менее излучение He-Ne лазера оказывало существенный терапевтический эффект в организме человека. За короткое время было накоплено огромное количество клинических данных в практике применения He-Ne лазера в терапии самых различных заболеваний.

Несмотря на положительные результаты клинических испытаний в научной среде возникали бурные дискуссии в оценке и интерпретации получаемых данных. Скептицизм и полное отрицание сопровождалось попытками дать научное обоснование наблюдаемым эффектам. Тем не менее лазерная терапия прочно утвердилась в современной медицине, наблюдается рост научных исследований и числа публикаций, изданы монографии и учебники [5–7]. В огромном потоке публикуемых результатов отсутствовали научно обоснованные подходы в их осмыслении и интерпретации.

Анализ литературы, доступный к 1997 г., позволил авторам выделить направление исследований по взаимодействию лазерного излучения с биотканью на клеточном уровне. Это направление интенсивно развивается и по настоящее время.

Взаимодействию же лазерного излучения с биотканью на молекулярном уровне практически не уделялось никакого внимания. В 1998 г. нами впервые была предложена концепция о роли лазерно-индуцированной фотодиссоциации HbO₂ крови *in vivo* в механизме биостимулирующего и терапевтического действия лазерного излучения [1].

Эта концепция стала фундаментом научно обоснованного подхода в изучении взаимодействия лазерного излучения с биотканью на молекулярном уровне, имея в виду действие света на гемоглобин (Hb) крови и его лигандов с различными газами и, прежде всего, с кислородом (O₂).

Суть идеи заключалась в целенаправленном воздействии лазерным излучением на HbO₂ крови различными способами, например, через кожный покров, или внутривенно, с целью дополнительной экстракции O₂ *in vivo* за счет его принудительной фотодиссоциации.

Как известно, кислород доставляется к клеткам биоткани путем микроциркуляции крови, и его концентрация является функцией [2]:

$$\Sigma O_2 (TcPO_2) = f(F(HbO_2)[O_2]),$$

где HbO_2 – концентрация оксигемоглобина; $TcPO_2$ – напряжение кислорода в кожной ткани и $[O_2]$ – концентрация кислорода в артериальной крови.

Совершенно очевидно, что любое нарушение микроциркуляции крови делает критичным быстрое его восстановление для поддержания потребности клеток биоткани в кислороде. Традиционно для восстановления концентрации кислорода при локальном его снижении задействуется вся система циркуляции крови. Для этого, прежде всего, используется метод гипервентиляции легких O_2 с помощью кислородной маски. Этот метод широко используется в клинической практике для восстановления нормального уровня оксигенации биоткани. При больших кровопотерях прибегают к оксигенации в барокамере при повышенном атмосферном давлении кислорода (метод гипербарической оксигенации – ГБО). Метод ГБО является весьма эффективным, но в силу технической сложности и вероятности кислородной интоксикации на практике применяется редко.

Таким образом, разработка новых высокоэффективных методов оксигенации биоткани является актуальной и социально значимой задачей.

В данной работе представлены результаты численного моделирования и анализа комплексного воздействия лазерного излучения на HbO_2 крови и MbO_2 мышечных тканей. Рассмотрены пути поиска эффективной оксигенации биотканей в зависимости от соотношения скоростей фотодиссоциации HbO_2 крови и MbO_2 мышечных тканей. С этой целью проведено численное моделирование взаимодействия лазерного излучения с MbO_2 мышечной ткани.

Методика расчета. Как было показано ранее в [3; 4], фотодиссоциация HbO_2 крови позволяет регулировать локальную концентрацию O_2 и, следовательно, степень насыщения биоткани кислородом. Эффективность данного процесса зависит от длины волны и выходной мощности лазерного излучения, плотности сосудов в зоне воздействия, оптических свойств и глубины расположения кровеносных сосудов в кожной ткани.

Для изучения влияния лазерного излучения на газообмен в биоткани была предложена трехслойная оптическая модель кожной ткани, состоящая из рогового слоя толщиной 10–200 мкм, эпидермиса (40–150 мкм) и самой дермы (1,0–4,0 мм).

Такая модель позволяет учитывать взаимодействие лазерного излучения хромофорами кожной ткани, что дает возможность численно рассчитать реальные спектры поглощения (спектры действия) Hb крови и его комплексов с лигандами O_2 и CO *in vivo*, в кожных кровеносных сосудах, с учетом экранирующего свет свойства эпидермиса, за счет поглощения меланина. Спектр поглощения меланина простирается от ультрафиолетовой области до ближнего инфракрасного спектрального диапазона.

С помощью данной модели исследовано явление лазерно-индуцированной оксигенации биоткани и ее роль в биомедицинских процессах. Показано, что фотодиссоциация HbO_2 крови позволяет регулировать уровень оксигенации биоткани непосредственно в зоне воздействия лазерным излучением.

Для исследования влияния лазерного излучения на MbO_2 мышечной ткани в трехслойную оптическую модель кожи добавлены два дополнительных слоя. Это – подкожная жировая клетчатка и мышечная ткань. Такая модель позволяет в комплексе исследовать влияние лазерного излучения на процесс газообмена в организме, который осуществляется по известной схеме аэробного метаболизма клеток.

Перенос O_2 от легких к клеткам биоткани осуществляется Hb крови. В артериальной крови Hb присутствует преимущественно в форме HbO_2 , а в венозной крови присутствуют обе формы гемоглобина.

В мышечной ткани аккумулятором кислорода является Mb – белок, сходный по строению и функциям с Hb крови. При острой необходимости MbO_2 подпитывает скелетные и сердечные мышцы молекулярным кислородом.

До настоящего времени не было проведено исследований влияния соотношения скоростей диффузии O_2 из плазмы крови в биоткань, его соединения с Mb и последующим высвобождением его от MbO_2 в мышечную ткань.

При исследовании этого вопроса нами использована пятислойная оптическая модель биоткани, представленная на рис. 1.

На основе предложенной модели проведено исследование соотношения скорости диффузии O_2 из плазмы крови в биоткань и его высвобождения от MbO_2 в мышечную ткань.

Для численного моделирования необходимо иметь данные *in vivo* о спектральных характеристиках биоткани, в частности, надежно измеренные спектры

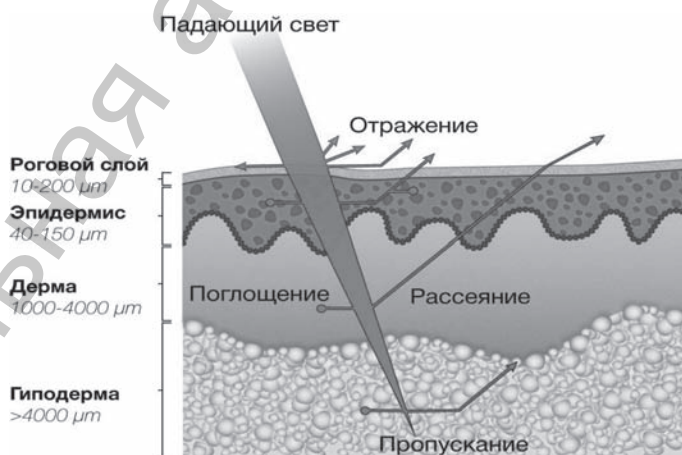


Рис. 1. Оптическая модель кожной ткани

поглощения ключевых хромофоров, таких как меланин, Hb, HbO₂, Mb, MbO₂, вода и липиды.

В литературе можно найти достоверную информацию по первым шести компонентам, а данные по спектральным характеристикам липидов весьма ограничены [5–8]. Для расчетов нами использован спектр поглощения липида – подкожно жировой клетчатки, приведенный в работе [5].

С использованием данного спектра (рис. 2) проведено численное моделирование и исследованы различные варианты реализации соотношения скоростей притока O₂ из плазмы крови в биоткань и его высвобождения от MbO₂ в мышечную ткань.

Исследованы различные варианты оксигенации биоткани в зависимости от соотношения скоростей притока O₂ из плазмы крови и его высвобождения от MbO₂ в результате фотодиссоциации на оксигенацию мышечной ткани.

Определены критерии выбора параметров комбинированного лазерного излучения для его эффективного использования в фототерапии с учетом наведенной фотодиссоциации HbO₂ крови и MbO₂ мышечной ткани.

Процесс лазерно-индуцированной оксигенации биоткани включает следующие две ступени:

- экстракция молекулярного кислорода от HbO₂ крови и повышение его концентрации в плазме крови;
- диффузия кислорода к кожной ткани и мышечным тканям.

Процесс диффузии кислорода зависит от плотности ткани отдельного индивиду. Расчет диффузии O₂ из плазмы крови в биоткань проведен на основе модели, представленной на рис. 3.

В этой модели использовано допущение, что ткань имеет гомогенную структуру с одинаковой плотностью по всему объему, а кровеносные сосуды (артериальные и венозные) расположены на глубине 0,5 мм. Кислород, высвобожденный в плазму артериальной крови, диффундирует через кожную ткань к электроду Кларка. Для данной модели и проведено решение уравнения диффузии.

При расчете использовались экспериментальные данные по влиянию лазерного излучения на степень оксигенации

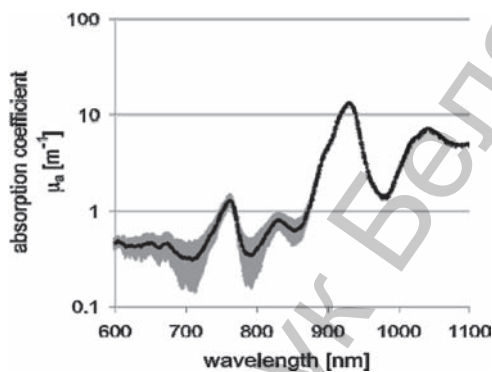


Рис. 2. Спектр поглощения липида (подкожно жировой клетчатки) [5]

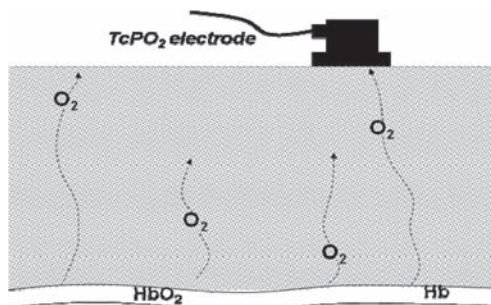


Рис. 3. Модель диффузии кислорода в биоткани

биоткани *in vivo* для различных типов кожной ткани, полученные нами ранее [9]. Численные расчеты показали, что во всех рассматриваемых случаях зарегистрировано примерно одинаковое увеличение (около 4,3 раза) скорости высвобождения кислорода из оксигемоглобина крови под воздействием лазерного излучения.

Таким образом, полученные результаты показывают, что в медицинской практике при проведении лазеротерапии необходимо принимать во внимание явление индуцированной фотодиссоциации HbO_2 и изменение локальной концентрации O_2 в зоне облучения. При комбинированном же воздействии лазерным излучением на двух длинах волн, например, аппаратом квантовой терапии «Витязь» (Республика Беларусь), одна из которых находится в ИК области спектра, следует также учитывать фотодиссоциацию MbO_2 в мышечных тканях.

Результаты и их обсуждение. Как было отмечено выше, до настоящего времени никакого внимания не обращалось на влияние фотодиссоциации MbO_2 на степень оксигенации мышечных тканей в зависимости от скорости диффузии O_2 из плазмы крови в биоткань и высвобождения его из оксимиоглобина мышечной ткани. Практический интерес представляет анализ возможных вариантов реализации оксигенации мышечной ткани, в зависимости от соотношения скоростей притока и ухода O_2 в мышечную ткань, на терапевтическую эффективность комбинированного действия лазерного излучения.

Ранее нами было показано, что лазерно-индуцированная фотодиссоциация HbO_2 позволяет повысить локальную концентрацию молекулярного кислорода непосредственно в зоне воздействия лазерным излучением. На основе этого явления разработана лазерно-оптическая технология оксигенации биотканей, которая позволяет регулировать и поддерживать оптимальную для метаболизма клеток концентрацию O_2 . Этот критерий можно использовать в качестве объективного параметра для достижения максимальной эффективности лазерной терапии. Для этого необходимо контролировать концентрацию O_2 в биоткани, поддерживая ее на необходимом уровне.

Вместе с тем на эффективность лазерной терапии может существенное влияние оказать фотодиссоциация MbO_2 в мышечной ткани. Для этого нами проведено численное моделирование взаимодействия лазерного излучения с MbO_2 в мышечной ткани. Рассмотрены особенности воздействия лазерного излучения на оксимиоглобин (MbO_2) мышечных тканей.

По аналогичной методике, использованной для расчета спектра действия HbO_2 , были рассчитаны спектры эффективного поглощения Mb и MbO_2 на различных глубинах мышечной ткани (рис. 4).

Как видно, характер трансформации спектров близок к тому, что имеет место и для спектров действия Hb и HbO_2 . Полученные спектры позволяют подобрать оптимальные длины волн лазерного излучения и путем фотодиссоциации MbO_2 изменять локальную концентрацию свободного кислорода в мышечных тканях. Полученные спектры действия как для HbO_2 , так и для MbO_2 показывают, что

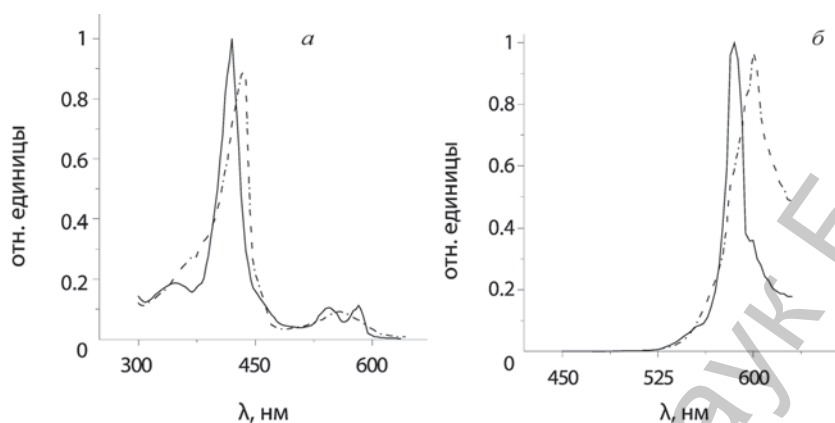


Рис. 4. Спектр поглощения миоглобина (сплошная кривая) и оксимиоглобина (пунктирная кривая) *in vitro* (а) и его спектры действия на глубине 2 мм (б)

при воздействии лазерным излучением через кожу на кровеносные сосуды и мышечную ткань происходит одновременная экстракция молекулярного кислорода.

При этом фотодиссоциация HbO_2 приводит к высвобождению кислорода в плазму крови с последующей диффузией в окружающие ткани. Вместе с тем фотодиссоциация MbO_2 приводит к высвобождению кислорода непосредственно в мышечную ткань. В этом случае существенное значение приобретает скорость притока кислорода из плазмы крови в мышечную ткань.

В лазерной терапии фотодиссоциация MbO_2 при недостаточном притоке кислорода может вызвать наведенную гипоксию в мышечной ткани и оказать негативное воздействие. Этот фактор необходимо учитывать при лазерной терапии комбинированного воздействия на двух длинах волн с использованием ИК излучения. Развитие исследований в данном направлении представляется перспективным для повышения эффективности лазерной терапии.

Заключение. Показано, что фотодиссоциация оксигемоглобина в кровеносных сосудах и миоглобина в мышечных тканях позволяет дополнительно экстрагировать молекулярный кислород, что дает возможность регулировать его локальную концентрацию в биоткани непосредственно в зоне воздействия лазерным излучением.

Полученные результаты могут быть использованы в современной медицине для предотвращения мышечной атрофии у малоподвижных больных и инвалидов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (проект № Ф11-013).

Литература

1. Асимов М. М., Асимов Р. М., Рубинов А. Н. // Тр. III конференции по лазерной физике и спектроскопии, 2–4 июля 1997 г., Гродно, Республика Беларусь. Минск, 1997. С. 169–172.
2. Radberg F. T., Back T. L., Tompson P. H., R. W. Hobson. // J. Surg. Res. 1996. Vol. 60. P. 365–369.

3. *Asimov M. M., Asimov R. M., Rubinov A. N.* // Proceedings of SPIE Laser-Tissue Interaction IX. 01.27–01.29.98. San Jose. CA. USA. 1998. Vol. 3254. P. 407–412.
4. *Асимов М. М., Асимов Р. М., Рубинов А. Н.* // Журн. прикл. спектр. 1998. Т. 65. С. 877–880.
5. *Van Veen R. L. P., Verkruijsse W., Sterenborg H. J. C. M.* // Opt. Lett. 2002. Vol. 27. P. 246–248.
6. *Doornbos R. M. P., Lang R., Aalders M. C.* et al. // Phys. Med. Biol. 1999. Vol. 44. P. 967–981.
7. *Cubeddu R., Musolino M., Pifferi A.* et al. // IEEE J Quantum Electron. 1994. Vol. 30. P. 2421–2430.
8. *Cubeddu R., Pifferi A., Taroni P.* et al. // Med. Phys. 1996. Vol. 23. P. 1625–1633.
9. *Асимов М. М., Королевич А. Н., Константинова Е. Е.* // ЖПС. 2007. Т. 74, № 1. С. 120–125.

M. M. ASIMOV, R. M. ASIMOV, A. N. RUBINOV

BIOMEDICAL APPLICATION OF LASER-INDUCED PHOTODISSOCIATION OF MUSCLE OXYMYOGLOBIN

Summary

The results of numerical simulation of interaction of laser radiation with myoglobin (Mb) and oxy-myoglobin (MbO₂) of muscle tissue are presented. It is shown that photodissociation of MbO₂ allows you regulate the concentration of oxygen (O₂) in muscle tissue, directly in the zone of laser irradiation. The criteria for the effectiveness of tissue oxygenation under effect by laser radiation at two wavelengths are considered. The results of investigations can be used in modern medicine to prevent muscle atrophy in not mobile patients or disabled.

УДК 547.91; 577.117.2; 577.117.3

Н. В. КОЗЕЛ¹, В. А. РАКОВИЧ², О. В. СЕРЕБРЕННИКОВА³,
Е. Б. СТРЕЛЬНИКОВА³, Е. В. ГУЛАЯ³, Н. Г. АВЕРИНА¹

РАСТИТЕЛЬНЫЕ ПИГМЕНТЫ ТОРФА КАК ИНДИКАТОР ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ БОЛОТНЫХ ЭКОСИСТЕМ БЕЛАРУСИ И ЗАПАДНОЙ СИБИРИ

¹Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси

²Институт природопользования НАН Беларуси

³Институт химии нефти СО РАН, Томск

(Поступила в редакцию 03.03.2014)

Анализ растительных пигментов в торфе естественной, нарушенной и восстанавливаемой болотных экосистем Беларуси свидетельствует об активно идущих процессах новообразования торфа в повторно заболоченных болотах. Изменение количества исследуемых растительных пигментов – тетрапирролов хлорофильной природы и каротиноидов – может быть хорошим индикатором наличия процессов торфообразования в болотных экосистемах. Отличия, выявленные в пигментном составе торфа Беларуси и Западной Сибири, демонстрируют существенный вклад в процесс торфообразования климатических факторов, а также типа растительности, населяющей торфяные болота, что нужно учитывать при разработке новых подходов для мониторинга функционального состояния болотных экосистем.

Введение. Болотные экосистемы играют важную роль в процессах связывания углерода и регенерации кислорода, поддержания водного баланса, а также сохранения биологического разнообразия [1]. Кроме того, болота являются источником многих незаменимых ресурсов, часть которых сконцентрирована в органических отложениях, накапливаемых в виде торфа. Торф является ценнейшим природным биологическим материалом и важнейшим минерально-сырьевым ресурсом. Он широко используется в сельском хозяйстве и животноводстве, медицине, биохимии, энергетике и ряде других областей промышленности [2].

Активное вовлечение болотных экосистем в традиционное природопользование приводит к их существенному изменению, что проявляется в быстром истощении биологических ресурсов этих экосистем, а также ставит под угрозу сохранение их биологического разнообразия. В настоящее время наметилась

тенденция по проведению мероприятий, направленных на восстановление нарушенных болотных экосистем. Так как формирование торфа отражает эффективность болотообразовательных процессов [3], актуальным является поиск новых химических индикаторов, адекватно отражающих функциональное состояние торфяных залежей естественных, нарушенных и восстанавливаемых болотных экосистем. Известно, что в торфе, который является продуктом разложения растительных остатков, присутствуют растительные пигменты, близкие по своим спектральным свойствам к каротиноидам и безмагниевым тетрапиррольным пигментам феофитину и феофорбиду [4; 5]. Степень сохранности этих пигментов в торфе весьма высокая и они могут служить индикаторами изменения состояния торфяно-болотных экосистем.

Цель исследования – выявление особенностей молекулярного состава органических соединений, в частности растительных пигментов, в торфе естественных, осушенных и восстанавливаемых болотных экосистем с целью получения дополнительной информации об условиях формирования торфяных болот в Беларуси и Западной Сибири в прошлом, а также оценки степени нарушения состава органического вещества в осушенных торфяных месторождениях, динамики их восстановления в условиях повторного заболачивания и прогнозирования их развития и рационального использования.

Материалы и методы исследования. В работе были использованы образцы торфа, отобранные на осушенных, восстанавливаемых и нативных участках торфяных месторождений низинного типа «Бартениха», кадастровый № 427, расположенного в Воложинском районе Минской области (Беларусь) и верхового типа «Червенское (Галое)», кадастровый № 604, расположенного в Червенском районе Минской области (Беларусь), а также на осушенных участках торфяного месторождения «Темное», расположенного на юге Томской области (Западная Сибирь, Россия).

Стратиграфическое бурение и отбор проб торфа из залежи производили в соответствии с существующими Методическими инструкциями по разведке торфяных месторождений [6; 7]. Образцы отбирали в пункте отбора проб послойно из одной или нескольких скважин, которые располагались в радиусе не более 10 м от места отбора первой пробы. Отбор образцов торфа производили полуметровым челноком торфоотборочного бура ТБГ-66, не нарушающим структуру торфа. Образцы отбирали от поверхности торфяной залежи до минерального дна послойно через 0,25 м и упаковывали в отдельные полиэтиленовые пакеты. Масса отобранной пробы была не менее 0,4 кг. Перед погружением бура в залежь для отбора следующей пробы челнок тщательно очищали. В одной скважине с каждой глубины пробу отбирали только один раз. При отборе проб вели полевой журнал, в котором фиксировали место отбора, номер пробы, глубину отбора, на какой анализ отбиралась проба и полевые оценки вида, типа и степени разложения торфа.

Название вида торфа давали по процентному соотношению растительных остатков [8]. Общая площадь, занятая остатками, видимыми под микроскопом, принималась за 100 % (пустоты не учитывались). Процентное содержание отдельных растений определяли глазомерно с округлением до 5 %. Если определенный вид растительных остатков занимал площадь менее 5 %, то он отмечался как единичный и не влиял на суммарную площадь всех растений. При анализе одной и той же пробы торфа путем передвижения покровного стекла просматривали до 10 полей. Для определения ботанического состава использовали атласы-определители остатков растений-торфообразователей [9], а также ГОСТ 21123–85 [8].

Определение степени разложения торфа в образцах, взятых из неосушенных залежей, осуществляли микроскопическим методом Варлыгина [10], используя ГОСТ 21123–85 [8]. Показатель степени разложения торфа вычисляли как среднеарифметическое просмотренных 30 полей.

Для определения зольности использовали типовой метод по ГОСТ 11306–83 [11]. Навеску торфа сжигали в муфельной печи при температуре 800 ± 25 °С и зольный остаток прокаливали до постоянного веса при той же температуре. Все взвешивания проводили на аналитических весах с точностью до 0,002 г. Результаты анализов каждого из двух параллельных определений зольности рассчитывали до сотых долей, а окончательный результат – среднее арифметическое из двух параллельных определений – округляли до десятых долей процента [12].

Обменную кислотность торфа определяли электрометрическим методом [12]. Навеску 20–30 см³ помещали в стеклянный стакан и заливали 1н КСl с рН 5,6–6,0 в отношении 2,5 объема к взятому объему торфа. Суспензию перемешивали и оставляли на 4–5 ч. Затем производили измерения рН при помощи рН-метра. Окончательные результаты округляли до десятых долей числа.

Качественную и количественную оценку содержания тетрапирролов и каротиноидов в образцах торфа проводили с помощью жидкостного хроматографа высокого давления Shimadzu Prominence LC 20 (Япония) с хроматографической колонкой Nucleodur C18 Gravity (тип C18, размер частиц 3 мкм, длина 15 см) фирмы Macherey-Nagel (Германия). В основу метода выделения, разделения и идентификации тетрапирролов хлорофильной природы, а также каротиноидов были положены методики, описанные в [13–15]. Они были модифицированы в приложении к образцам торфяного происхождения согласно [4]. Для экстракции пигментов сухие образцы торфа размельчали до порошкообразного состояния, после чего многократно промывали ацетоном. Степень вымывания пигментов контролировали по спектрам поглощения на спектрофотометре Uvikon 931 фирмы Kontron (Германия). Затем ацетоновый экстракт упаривали до определенного объема. Далее в виалы для хроматографии вносили по 0,5 мл ацетонового экстракта и помещали в камеру хроматографа. Объем инъекции составлял 50 мкл. Разделение пигментов в колонке производили с использованием растворов А (90 % ацетонитрила, 9,9 % Н₂О, 0,1 % триэтиламина) и В (100 % этилацетат) по программе (табл. 1) с потоком 0,5 мл/мин. Пигменты регистрировали спектрофо-

тометрическим детектором с диодной матрицей Shimadzu SPD-M20A (Япония) в диапазоне 200–800 нм. Для визуализации профиля хроматограммы выделяли спектр поглощения при 410 нм. Для количественного определения пигментов использовали площади пиков хроматограммы. Для более точной идентификации растительных пигментов регистрировали флуоресценцию разделенных веществ флуориметрическим детектором Shimadzu DGU-20A (Япония) при длине волны регистрации 670 нм (длина волны возбуждающего света 410 нм).

Таблица 1. Программа изменения концентрации растворителей для разделения растительных пигментов на хроматографической колонке Nucleodur C18 Gravity (тип C18, размер частиц 3 мкм, длина 15 см)

Время, мин	Скорость потока, мл/мин	Раствор А, %	Раствор В, %	Режим
0,01	0,5	100	0	Линейный градиент
15,00	0,5	0	100	Изократический режим
18,00	0,5	0	100	Линейный градиент
19,00	0,5	100	0	Изократический режим
25,00	0,5	100	0	Остановка

Результаты и их обсуждение. Первоначально были проанализированы общетехнические характеристики исследуемых образцов торфа, отобранных из верховой и низинной залежей Беларуси (табл. 2).

Таблица 2. Характеристика торфа верховой и низинной залежей Беларуси

Номер образца торфа	Глубина отбора, м	Вид торфа	Залежь	R, %	Влага, %	A, %	pH
<i>Верховые торфа т. м. Червенское (Галое)</i>							
151	0,0–0,1	Магелланикум	Естеств.	10	90,6	2,7	3,8
152	0,1–0,2	Магелланикум	Естеств.	15	91,1	2,5	3,7
153	0,0–0,1	Магелланикум	Восстан.	10	76,7	4,5	3,6
154	0,1–0,2	Магелланикум	Восстан.	10	86,5	10,1	3,7
155*	0,0–0,1	Гипновый переходный	Осушен.	5–10	43,1	5,7	4,2
156	0,1–0,2	Пушицево-сфагновый	Осушен.	15–20	82,6	2,7	4,1
<i>Низинные торфа т. м. Бартениха</i>							
115Б	0,0–0,1	Древесно-тростниковый	Естеств.	35	76,3	6,2	5,2
121	0,0–0,1	Тростниковый	Восстан.	30–35	72,4	13,6	5,4
122	0,0–0,1	Осоково-гипновый	Осушен.	20–25	38,8	6,2	6,5
127	0,0–0,1	Осоковый	Восстан.	25	70,4	6,7	5,3
128	0,0–0,1	Ольховый	Осушен.	40	42,2	6,4	6,2

П р и м е ч а н и е. R – степень разложения торфа; A – зольность; т. м. – торфяное месторождение; * – на сфагновой подложке после осушения и пожара поселился гипновый мох.

Как видно из табл. 2, участки естественного болота № 151 и 152 в верхней части залежи 0,0–0,2 м слагаются магелланикум торфом со степенью разложения 10–15 %, повторно заболоченные участки № 153 и 154 – магелланикум торфом со степенью разложения 10 %, подсушенные участки № 155 и 156 – гипновым переходным и пушицево-сфагновым торфом со степенью разложения 5–10 и 15–20 % соответственно.

Участок естественного болота № 115Б в верхней части залежи 0,0–0,1 м слагается древесно-тростниковым торфом со степенью разложения 35 %, повторно заболоченный участок № 121 – тростниковым торфом со степенью разложения 30–35 %, подсушенный участок № 122 – осоково-гипновым торфом со степенью разложения 20–25 %, повторно заболоченный участок № 127 – осоковым торфом со степенью разложения 25 %, а подсушенный участок № 128 – ольховым торфом со степенью разложения 40 %.

На участках естественного болота (№ 151, 152) значение влаги на глубине отбора проб 0,0–0,1 м составило 90,6 %, зольности – 2,7 %, рН – 3,8 (табл. 2); на глубине 0,1–0,2 м – 91,1 %, 2,5 %, 3,7 соответственно (данные в таблице не представлены). На повторно заболоченных после пожара участках (№ 153, 154) значение влаги на глубине отбора проб 0,0–0,1 м составило 76,7 %, зольности – 4,5 %, рН – 3,6; на глубине 0,1–0,2 м – 86,5 %, 10,1 %, 3,7 соответственно. На подсушенных участках болота (№ 155, 156) значение влаги на глубине отбора проб 0,0–0,1 м составило 43,1 %, зольности – 5,7 %, рН – 4,2; на глубине 0,1–0,2 м – 82,6 %, 2,7 %, 4,1 соответственно.

На участке естественного болота (№ 115Б) значение влаги на глубине отбора проб 0,0–0,1 м составило 76,3 %, зольности – 6,2 %, рН – 5,2. На повторно заболоченном участке (№ 121) значение влаги на глубине отбора проб 0,0–0,1 м составило 72,4 %, зольности – 13,6 %, рН – 5,4; на подсушенном (№ 122) – 38,8 %, 6,2 %, 6,5 соответственно. На повторно заболоченном участке болота (№ 127) значение влаги на глубине отбора проб 0,0–0,1 м составило 70,4 %, зольности – 6,7 %, рН – 5,3; на подсушенном (№ 128) – 42,2 %, 6,4 %, 6,2 соответственно. Отметим, что на осушенных участках низинных болот значение рН было больше, чем в неосушенных, что хорошо согласуется с литературными данными [16].

Таким образом, представленные результаты показывают, что по большинству общетехнических показателей повторное заболачивание болот приближает состояние залежей к таковому в естественных болотных экосистемах.

Анализ образцов торфа на наличие в них растительных пигментов позволил выявить в исследуемых препаратах наличие каротиноидов и порфиринов хлорофильной природы. На рис. 1 представлена типичная для исследованных препаратов хроматограмма ацетонового экстракта из образца торфа верхового типа № 155 нарушенной болотной экосистемы с ярко выраженными пиками феофитина *b* (пик № 1, время удержания 10,60 мин) и феофитина *a* (пик № 2, время удержания 11,49 мин). Наличие безметаллических порфириновых пигментов хлорофильной природы в образцах торфа не удивительно, так как известно, что для получения порфиринов достаточно незначительного химического воздействия на молеку-

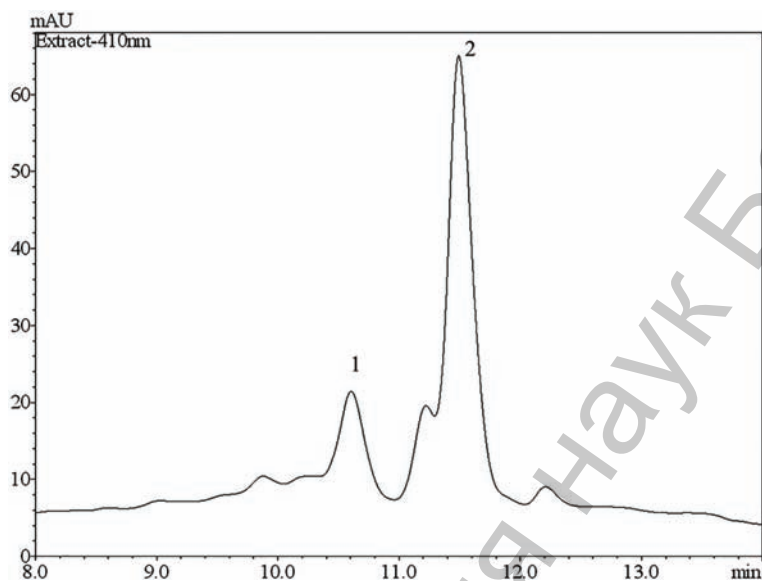


Рис. 1. Хроматограмма экстракта растительных пигментов из образца торфа верхового типа № 155 нарушенной болотной экосистемы. Пик № 1 принадлежит феофитину *b* (время удержания 10,60 мин), пик № 2 – феофитину *a* (время удержания 11,49 мин)

лу хлорофилла, что вполне реализуемо в исследуемом материале, поскольку для торфа характерны кислые значения pH, при которых ион Mg^{2+} в молекуле хлорофилла легко замещается на два протона [17].

Анализ образцов торфа, отобранных на осушенных, восстанавливаемых и нативных участках торфяных месторождений верхового типа «Червенское (Галое)» (образцы № 151, 152, 153, 154, 155, 156) и низинного – «Бартениха» (образцы № 115Б, 121, 122, 127, 128) показал существенные качественные и количественные различия в содержании порфиринов и каротиноидов в исследованных пробах.

Так, в образцах торфа верхового типа естественной, нарушенной и восстанавливаемой экосистем зафиксировано наличие феофитина *a* и феофитина *b*, однако количество этих пигментов различалось в зависимости от типа торфа (табл. 3). Наибольшее содержание феофитина *a* и феофитина *b* было выявлено в образцах № 153 и 154, взятых из повторно заболоченного после пожара болота. Наименьшие количества указанных пигментов были зафиксированы в образцах торфа из естественных болот (№ 151, 152). Осушенные болота (образцы № 155 и 156) характеризовались несколько большим содержанием феофитина *a* и феофитина *b*, нежели естественные.

Также важно отметить, что образец торфа № 153 из повторно заболоченного после пожара торфяного месторождения кроме указанных растительных пигментов содержал хлорофиллы *a* и *b*, а также каротиноиды – лютеин и β -каротин, причем хлорофиллы и β -каротин были выявлены только в этом образце. Указанные пигменты представлены на хроматограмме (рис. 2). Четко видны пики

лютеина (пик № 1, время удержания 6,19 мин), хлорофилла *b* (пик № 2, время удержания 8,99 мин), хлорофилла *a* (пик № 3, время удержания 9,85 мин), феофитина *b* (пик № 4, время удержания 10,60 мин), феофитина *a* (пик № 5, время удержания 11,49 мин) и β -каротина (пик № 6, время удержания 12,19 мин). На рис. 3 представлены спектры этих пигментов, зарегистрированные спектрофотометрическим детектором с диодной матрицей, нормированные на единицу. В образце торфа № 155 (хроматограмма представлена на рис. 1) из осушенного болота был выявлен в незначительном количестве лютеин, а в образце торфа № 156, также из осушенного болота, зарегистрирован другой каротиноид – неоксантин (хроматограмма не представлена), отсутствующий во всех остальных пробах.

Таблица 3. Содержание пигментов хлорофильной природы и каротиноидов в образцах торфа верхового типа естественной, нарушенной и восстанавливаемой болотных экосистем Беларуси, мкг/г сухой массы

Номер образца торфа	Феофитин <i>a</i>	Феофитин <i>b</i>	Хлорофилл <i>a</i>	Хлорофилл <i>b</i>	Неоксантин	Лютеин	β -каротин
151	0,53	0,22	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.
152	1,56	1,03	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.
153	6,89	3,06	3,05	3,11	н. о.	0,59	0,58
154	9,70	2,62	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.
155	4,77	2,12	н. о.	н. о.	н. о.	0,09	н. о.
156	3,53	1,41	н. о.	н. о.	4,21	н. о.	н. о.

Примечание. Здесь и далее н. о. – не обнаружено.

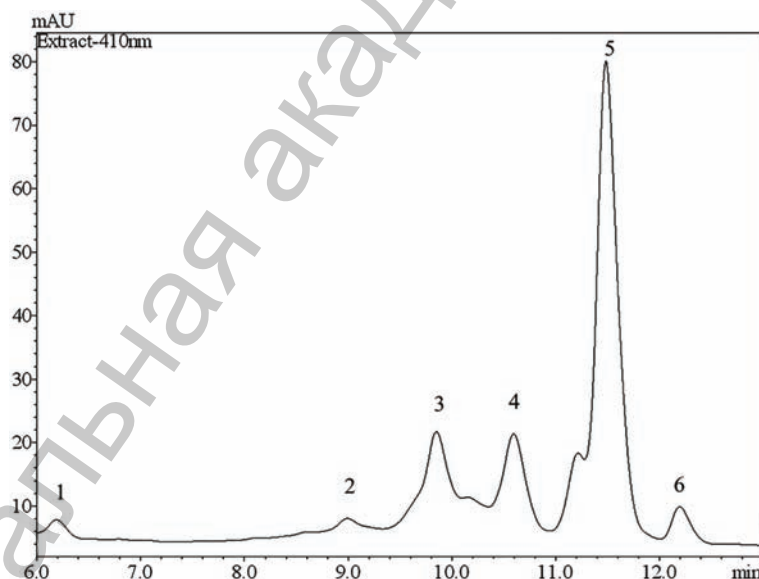


Рис. 2. Хроматограмма экстракта растительных пигментов из образца торфа верхового типа № 153 восстанавливаемой болотной экосистемы. Описание пиков в тексте

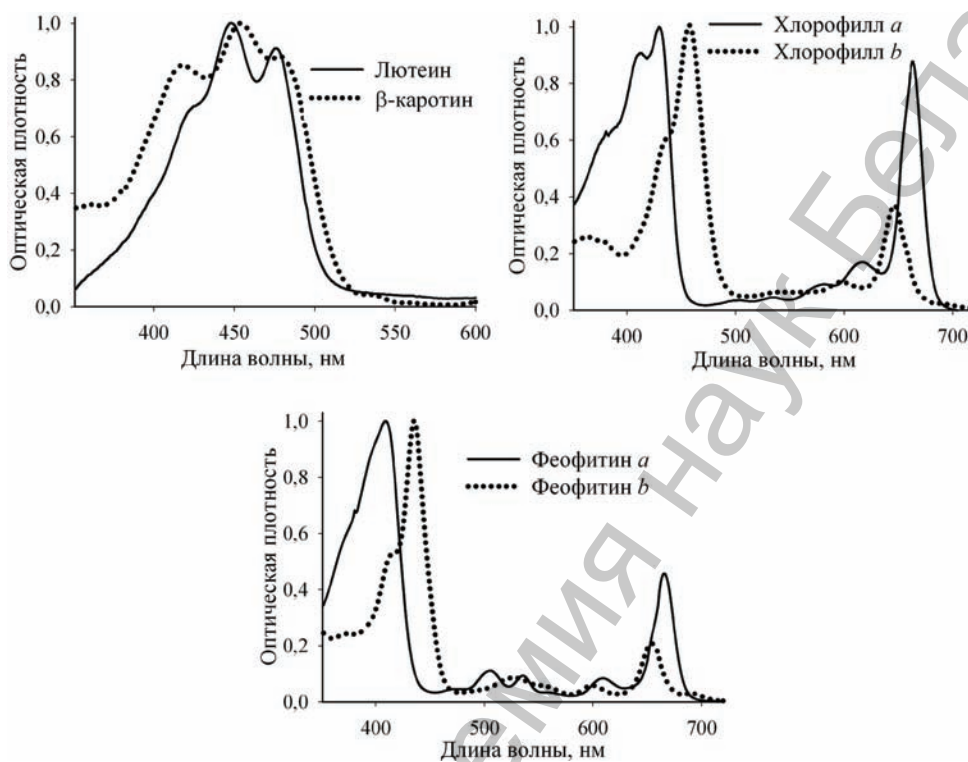


Рис. 3. Спектры пигментов, выделенных из образца торфа верхового типа № 153 восстанавливаемой болотной экосистемы. Спектры нормированы на единицу

Повторное заболачивание низинных залежей также привело к превышению содержания феофитиновых пигментов в них по сравнению с осушенными болотами. Так, анализ полученного материала показывает, что суммарное содержание феофитинов в образце торфа № 121, взятом из восстанавливаемой части болота (3,7 мкг/г сухой массы), более чем в два раза превышает таковое в образце торфа № 122 осушенной залежи (1,4 мкг/г сухой массы). Такая же картина наблюдается в случае двух других залежей № 127 и 128, относящихся к восстанавливаемым и осушенным торфяным месторождениям соответственно. Отметим, что в образцах торфа восстанавливаемых и в меньшем количестве в образцах из осушенных болот был выявлен еще один пигмент растительного происхождения хлорофильной природы – феофорбид, который отсутствовал в образцах верхового типа. Это может свидетельствовать о вкладе в процессы торфообразования восстанавливаемых залежей новых растительных остатков и об активно идущих в этих болотах процессах торфообразования.

Особое внимание стоит уделить тому, что значительная доля в пигментном составе низинного торфа восстанавливаемых залежей принадлежит бактериофеофитину *b*, что указывает на существенный вклад в торфообразование на этих участках болот фотосинтезирующих видов бактерий (табл. 4).

Таблица 4. Содержание тетрапирролов хлорофильной природы в низинном торфе естественной, нарушенной и восстанавливаемой болотных экосистем Беларуси, мкг/г сухой массы

Номер образца торфа	Феофитин <i>a</i>	Феофитин <i>b</i>	Бактериофеофитин <i>b</i>	Феофорбид <i>a</i>
115Б	6,2	4,8	н. о.	н. о.
121	1,1	0,4	1,6	0,6
122	1,0	0,4	н. о.	н. о.
127	0,8	0,4	1,0	0,45
128	0,8	0,3	следы	0,07

Также были проанализированы образцы торфа верхового (№ 1–5) и низинного (№ 6–9) типов, взятые на осушенных участках болота «Темное», расположенного на юге Томской области (Западная Сибирь, Россия). В образцах торфа Западной Сибири также идентифицированы растительные пигменты порфириновой природы и каротиноиды (табл. 5, 6).

Таблица 5. Содержание тетрапирролов хлорофильной природы в верховом торфе Западной Сибири, мкг/г сухой массы

Номер образца торфа,	Глубина отбора пробы, м	Феофитин <i>a</i>	Феофитин <i>b</i>	Бактериофеофитин <i>a</i>	Бактериофеофитин <i>b</i>	Феофорбид <i>a</i>
1	0,7–1	7,20	13,32	н. о.	н. о.	н. о.
2	1,6–1,7	5,87	2,24	н. о.	н. о.	н. о.
3	1,7–2,0	10,44	11,19	н. о.	н. о.	н. о.
4	2,65–2,9	19,65	следы	114,20	следы	9,63
5	3,85–4	18,31	следы	90,01	35,98	13,37

Таблица 6. Содержание тетрапирролов хлорофильной природы и каротиноидов в низинном торфе Западной Сибири, мкг/г сухой массы

Номер образца торфа	Глубина отбора пробы, м; вид торфа	Феофитин <i>a</i>	Феофитин <i>b</i>	Бактериофеофитин <i>a</i>	Бактериофеофитин <i>b</i>	Феофорбид <i>a</i>	Лютеин
6	0,25; осоковый	1,10	0,69	н. о.	н. о.	0,09	0,21
7	0,25; древесно-травяной	6,70	следы	21,03	15,16	2,14	2,26
8	1	4,94	4,79	следы	следы	1,86	1,33
9	1,5	4,48	следы	13,63	8,90	2,01	2,48

По сравнению с образцами торфа болот Беларуси выявлены существенные отличия в пигментном составе исследуемых проб. Так, образцы, отобранные в Западной Сибири, значительно больше обогащены феофитинами и бактериофеофитинами. Особенно высокое содержание бактериофеофитинов (114–126 мкг/г сухой массы) зафиксировано в ряде образцов верховых залежей, расположенных на глубине более 2,6 м, что также указывает на активное участие в формировании

нии торфа Западной Сибири бактериальной микрофлоры. Об активном участии фотосинтезирующих бактерий в формировании торфа Западной Сибири также свидетельствует наличие в исследованных образцах кроме бактериофеофитина *b* бактериофеофитина *a*, который отсутствовал в торфе Беларуси. При этом важно отметить, что в образцах торфа Западной Сибири выявлен только один каротиноид – лютеин, который присутствует в незначительных количествах (0,2–2,5 мкг/г сухой массы) во всех образцах низинного торфа, но отсутствует в верховых.

Такие различия между пигментным составом торфа Беларуси и Западной Сибири могут быть связаны с климатическими особенностями этих регионов, а также различиями в населяющей исследуемые болотные экосистемы растительности. Важную роль типа растительности при формировании торфяных залежей подтверждает выявленное нами различие в пигментном составе между образцами торфа № 6 и 7, отобранными на одинаковой глубине (0,25 м) и отличающимися типом растительности участка болота, где проводили отбор проб. Так, для осокового торфа (образец № 6) характерно низкое содержание феофитинов, феофорбида, лютеина, и отсутствие бактериофеофитинов, в то время как для древесно-травяного торфа (образец № 7) зарегистрировано наиболее высокое содержание из всех исследованных образцов низинного торфа Западной Сибири феофитина *a* – 6,7 мкг/г сухой массы, бактериофеофитинов – 36,19 мкг/г сухой массы и феофорбида *a* – 2,14 мкг/г сухой массы.

Заключение. Таким образом, результаты, полученные нами при анализе растительных пигментов в торфе естественной, нарушенной и восстанавливаемой болотных экосистем Беларуси, свидетельствуют об активно идущих процессах новообразования торфа в повторно заболоченных торфяных месторождениях. Изменение количества исследуемых растительных пигментов – тетрапирролов хлорофильной природы и каротиноидов – может быть хорошим индикатором наличия процессов торфообразования в болотных экосистемах. Отличия, выявленные в пигментном составе торфа Беларуси и Западной Сибири, демонстрируют существенный вклад в процесс торфообразования климатических факторов, а также типа растительности, населяющей торфяные болота, что нужно учитывать при разработке новых подходов для мониторинга функционального состояния болотных экосистем.

Авторы выражают благодарность Белорусскому республиканскому фонду фундаментальных исследований, при финансовой поддержке которого (грант № X12CO–024) были выполнены эти исследования.

Литература

1. Бамбалов Н. Н., Ракович В. А. Роль болот в биосфере. Минск: Белорус. наука, 2005. – 287 с.
2. Курзо Б. В. Закономерности формирования и проблемы использования сапропеля. Минск: Белорус. наука, 2005. – 223 с.
3. Вомперский С. Э., Ковалёв А. Г., Глухова Т. В. и др. // Материалы Междунар. симпозиума «Болотные экосистемы севера Европы: разнообразие, динамика, углеродный баланс, ресурсы и охрана». Петрозаводск, 2006. С. 48–59.

4. Аверина Н. Г., Поликарпова Н. Н. // Изв. АН БССР. Сер. хим. наук. 1981. № 1. С. 102–106.
5. Зверева А. В., Писарева С. И., Юдина Н. В. // Химия растительного сырья. 1999. № 4. С. 31–34.
6. Инструкция по разведке торфяных месторождений. М.: М-во геологии СССР, 1984. – 193 с.
7. Тюремнов С. Н., Ларгин И. Ф., Ефимова С. Ф. и др. Торфяные месторождения и их разведка: руководство по лабораторно-практическим занятиям. М.: «Недра», 1977. – 264 с.
8. Торф. Термины и определения. ГОСТ 21123–85. М.: Изд-во стандартов, 1985. – 46 с.
9. Домбровская А. В., Коренева М. И., Тюремнов С. Н. Атлас растительных остатков, встречаемых в торфе. М.: Госэнергоиздат, 1959. – 137 с.
10. Варлыгин П. Д. // Тр. юбил. сес., посвящ. столетию со дня рожд. В. В. Докучаева. М., 1949. С. 623–627.
11. Торф и продукты его переработки. Методы определения зольности. ГОСТ 11306–83. М.: Изд-во стандартов, 1983. – 7 с.
12. Лиштван И. И., Король Н. Т. Основные свойства торфа и методы их определения. Минск, 1975. – 319 с.
13. Milenković S. V., Zvezdanović J. B., Anđelković T. D. et al. // Advanced technologies. 2012. Vol. 1. P. 16–24.
14. Forni E., Ghezzi M., Polesello A. // Chromatography. 2012. Vol. 1. P. 120–124.
15. Olajire A. A., Ameen A. B., Abdul-Hammed M. et al. // J. Fuel. Chem. Technol. 2007. Vol. 35. P. 641–647.
16. Ларгин И. Ф., Лавров Н. В. // Методы изучения болот и их охрана. Мат. конф. Вильнюс, 1986. С. 53–57.
17. Hsu C.-Y., Chao P.-Y., Hu S.-P. et al. // Food and Nutrition Sciences. 2013. Vol. 4. P. 1–8.

*N. V. KOZEL, V. A. RAKOVICH, O. V. SEREBRENNIKOVA, E. B. STRELNIKOVA,
E. V. GULAYA, N. G. AVERINA*

**PLANT PIGMENTS OF PEAT AS AN INDICATOR OF FUNCTIONAL STATE
OF WETLAND ECOSYSTEMS OF BELARUS AND WESTERN SIBERIA**

Summary

It was shown that the amount of tetrapyrroles of chlorophyll nature and carotenoids can be a good indicator of peat formation in wetland ecosystems.

УДК 57.084.1

Е. А. ПАВЛЮЩИК, И. А. ЖУКОВА, И. С. ДОРОФЕЕНКО,
Т. В. ЧУКАРИНА, В. Ю. АФОНИН

ВЛИЯНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ И СРЕДОВЫХ ФАКТОРОВ НА ПОКАЗАТЕЛИ КРОВИ В УСЛОВИЯХ НАСЛЕДСТВЕННОЙ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ К АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ

Институт биоорганической химии НАН Беларуси

(Поступила в редакцию 19.06.2014)

Изучены гематологические и молекулярно-биологические показатели периферической крови и морфология лейкоцитов крыс линий WKY и SHR в условиях комплексной эмоционально-физической нагрузки. Проведена оценка изменений показателей пролиферации и клеточной гибели лейкоцитов на фоне разных сезонов года и инкубации цельной крови животных при температуре 4 °С на протяжении 24 ч. Для определения гематологических показателей крови использовали автоматический гематологический анализатор, молекулярно-биологические показатели измеряли методом проточной цитофлуориметрии. Установлено, что в условиях проведенной физической нагрузки снижается количество иммунокомпетентных клеток и усиливается их гибель. Исследуемые показатели значительно варьируют на протяжении года. С помощью световой микроскопии выявлено, что при инкубации крови лейкоциты обеих линий крыс в значительной мере подвержены апоптотическим изменениям.

Введение. Оценка уровня повреждений ДНК лимфоцитов у людей с артериальной гипертензией (АГ) показала, что между процентом хромосомных аберраций, которые преимущественно были представлены разрывами хроматид, существовала положительная линейная зависимость от диастолического давления. Так же было установлено, что лимфоциты больных более чувствительны к повреждающему действию канцерогена, чем лимфоциты людей с нормальным давлением [1]. Результаты о наличии связи между артериальной гипертензией и повреждениями ДНК лейкоцитов были подтверждены еще в нескольких исследованиях. Большинство авторов объясняют эти повреждения ДНК у больных увеличенной выработкой активных форм кислорода [2–4], которые, как известно, имеют тенденцию накапливаться и повреждать клеточные макромолекулы, включая генетический материал [5]. Аналогичные результаты получили на крысах линии

SHR, которые генетически предрасположены к развитию спонтанной АГ [4; 6]. У животных по сравнению с контрольными нормотензивными крысами линии WKY наблюдается значительно повышенный уровень 8-ОН-дезоксигуанозина в моче [4] и в целом значительно больше хромосомных повреждений и аномальных метафаз [6]. Однако механизмы и причины увеличенного, предположительно окислительного, повреждения ДНК у больных с АГ остаются неясными и требуют дальнейшего изучения.

Согласно имеющимся данным, такие факторы, как интенсивная длительная физическая нагрузка, инкубация крови и сезон года могут иметь повреждающее действие на клетки [7–9; 10–15]. Так как у больных АГ наблюдается иммуносупрессия и увеличена гибель лейкоцитов [16; 17], вероятно, что при воздействии дополнительных повреждающих факторов крысы линии SHR будут более остро на них реагировать, чем их нормотензивный контроль. Апоптоз, микроядра и накопление клеток на определенной стадии клеточного цикла связаны с повреждениями ДНК. Некоторые повреждения ДНК активируют апоптоз, который является механизмом элиминации клетки [18; 19]. Оценка клеточного цикла также важна, так как несколько его контрольных точек не позволяют клетке с повреждениями ДНК вступить в следующую фазу [20]. Клетки с микроядрами, как маркеры повреждения ДНК, могут иметь апоптотическую природу и свидетельствовать о смене механизма клеточной гибели и/или являться результатом накопления клеток с нарушением генетического материала в отдаленные сроки при патологиях репарации ДНК на фоне предыдущей активации пролиферации [21].

Цель работы – оценка показателей периферической крови и лейкограммы крыс линий SHR и WKY, а также изучение уровня повреждений ДНК лейкоцитов в условиях комплексной эмоционально-физической нагрузки, инкубации периферической крови в течение 24 ч при 4 °С и смены сезона.

Материалы и методы исследований. 72 трехмесячных крысы-самца линий SHR и WKY исходной массой тела 275–290 г были разведены и получены из вивария отдела экспериментально-биологических моделей Института биоорганической химии НАН Беларуси. Для опыта отбирали здоровых особей с чистым и гладким шерстным покровом и нормальной поведенческой активностью.

Из общей партии отобранных животных линии SHR сформировали 6 равноценных групп по 6 животных, которых рассаживали в отдельные клетки. У первой – интактной группы животных производили забор крови 27 апреля, у второй – 31 мая, у третьей – 3 сентября и у четвертой – 26 ноября. У пятой и шестой групп подопытных животных кровь забирали также 3 сентября и 26 ноября соответственно, но перед этим животные в течение двух недель ежедневно получали комплексную эмоционально-физическую нагрузку в виде принудительного продолжительного бега на вращающейся системе Rat forced exercise walking wheel system (Lafayette instrument, США) с отдельным колесом для каждой из крыс. Скорость и время вращения колес устанавливались с помощью электронного пульта управления. Механизм широко используется в фармакологических ис-

следованиях и позволяет оценить выносливость экспериментальных животных и переносимость ими физической нагрузки [22; 23]. Перед экспериментом на протяжении 5 дней ежедневно крыс подвергали незначительной нагрузке в течение 10 мин на низкой скорости вращения колеса, постепенно увеличивая интенсивность бега в целях обучения и адаптации животных. Крысы, отказывающиеся бегать, исключались из исследования. Временами, когда животное цеплялось за колесо, его осторожно подталкивали, чтобы обеспечить его постоянное движение. В дальнейшем животные бегали 5 дней в неделю 14–15 мин в день с постепенно увеличивающейся скоростью вращения колеса от 7 до 11 м/мин. Так как согласно данным многих исследователей, именно интенсивные и постоянные тренировки ведут к снижению активности клеток иммунной системы [24] и к повреждениям ДНК [7; 8], был выбран соответствующий временной интервал в 13 недель, на протяжении которого крысы подвергались физической нагрузке. После 13 недель бега и с интервалом после последней физической нагрузки в 3 дня у крыс забирали кровь для исследования. Кровь четвертой, пятой и шестой групп животных дополнительно подвергалась инкубации при 4 °С в течение 24 ч с момента взятия.

Аналогично проводили эксперимент с животными линии WKY.

Забор крови для гематологических и молекулярно-биологических исследований производили из боковой хвостовой вены. Для определения морфологических показателей крови использовали автоматический гематологический анализатор Numacount (Human GmbH, Германия). Молекулярно-биологические показатели измеряли методом проточной цитофлуориметрии, используя лазерный проточный цитометр FC 500 (Beckman Coulter, США). С его помощью, на основании гистограмм распределения содержания ДНК в клетках, изучали основные показатели клеточного цикла (распределение клеток по стадиям), частоту клеток с признаками апоптоза (гиподиплоидное содержание ДНК) и микроядрами. Для анализа крови с помощью проточного цитометра кровь из хвостовой вены животного отбирали в пробирку, содержащую гепарин (Белмедпрепараты, Республика Беларусь). 100 мкл пробы смешивали с лизирующим буфером (Beckman Coulter, Франция), по истечении 10 мин центрифугировали в течение 5 мин при 1500 об/мин при комнатной температуре. Надосадочную жидкость удаляли, к осадку добавляли 3 мл фосфатно-солевого буфера (ФСБ) (Beckman Coulter, Франция), тщательно перемешивали на Vortex и снова центрифугировали в течение 5 мин при 1500 об/мин при комнатной температуре. Процедуру отмывки повторяли еще раз. Фиксировали клетки в 70 %-ном охлажденном этиловом спирте и оставляли на ночь в морозильной камере. К промытым ФСБ клеткам добавляли рибонуклеазу А (Sigma, Германия) и окрашивали гипотоническим раствором пропидия йодида (CarlRoth, Германия) в течение 15 мин при комнатной температуре в темноте в полистирольных пробирках 12 × 75 мм. На каждый вариант опыта просчитывали не менее 10000 клеток. Клеточные циклы G0/G1, S, G2/M определяли, используя программу Multicycle Cell Cycle.

Для морфологической характеристики лейкоцитов использовали мазки, окрашенные по методу Романовского–Гимза. Изменения лейкоцитов оценивали, используя микроскоп Leica DM4000B (Leica Microsystems, Германия), путем подсчета лейкоцитов, находящихся на той или иной стадии клеточной гибели на 100 нормальных клеток при увеличении $\times 1000$.

Статистическую обработку данных осуществляли с использованием пакета программ «Statistica 7». Для анализа гематологических показателей периферической крови крыс линии SHR и WKY в условиях физической нагрузки применяли *t*-критерий Стьюдента для независимых переменных. Влияние физической нагрузки на молекулярно-биологические показатели периферической крови и инкубации цельной крови при 4 °C на гибель лейкоцитов у крыс линии SHR и WKY оценивали с помощью *U*-критерия Манна–Уитни. При определении воздействия времени года на показатели проточной цитофлуориметрии использовали односторонний дисперсионный анализ Краскела–Уоллиса. Нулевую гипотезу отвергали в случае $p < 0,05$. Значения представлены в виде средней \pm стандартная ошибка средней ($X \pm Sx$) и средней \pm стандартное отклонение ($X \pm Sd$).

Результаты и их обсуждение. *Физическая нагрузка.* Анализ гематологических показателей периферической крови крыс линий SHR и WKY показал различия в кинетике популяций клеток лейкоцитарного ряда, которые усиливались в условиях физической нагрузки и эмоционального стресса. Как видно из показателей гемопоэза, физические нагрузки отрицательно сказываются на количестве иммунных клеток в крови животных. Особенно это выражено у крыс линии SHR (табл. 1).

Так, в сентябре при исследовании показателей крови животных линии SHR, получавших физическую нагрузку, наблюдалось достоверное снижение числа лейкоцитов на 38 % ($p < 0,001$), лимфоцитов на 42 % ($p < 0,001$), моноцитов на 56 %, гранулоцитов на 28 % по сравнению с группой контроля. При анализе гематологических показателей у животных линии WKY отмечались также их изменения по сравнению с группой контроля, однако высокая вариабельность показателей привела к отсутствию статистически значимых результатов. В ноябре общая тенденция пониженного количества лейкоцитов периферической крови у крыс групп SHR и WKY при физической нагрузке сохранилась. Показатели крови крыс линии SHR не настолько различны от контроля как в сентябре, но все же под влиянием комплексной эмоционально-физической нагрузки количество лейкоцитов снизилось на 15 %. В группе животных линии WKY, получавших физическую нагрузку, наблюдалось снижение количества лейкоцитов на 8 %.

Данные литературы указывают на то, что интенсивные и постоянные нагрузки изменяют количество и функции клеток иммунной системы, циркулирующих в периферической крови, таких как нейтрофилы, моноциты и натуральные киллеры [25; 26]. Однако отсутствуют данные о влиянии длительных нагрузок на гематологические показатели крыс с иммуносупрессией. Изучение влияния интенсивности нагрузки на общее количество лейкоцитов и их субпопуляций

у женщин с лишним весом показало, что общее количество лейкоцитов и субпопуляция нейтрофилов значительно уменьшается под влиянием нагрузок. Причем у женщин, у которых изначально количество лейкоцитов было завышено, установлена прямо пропорциональная связь между интенсивностью нагрузок и уровнем лейкопении [27]. Принимая во внимание, что повышенный уровень лейкоцитов ассоциируется с увеличенным риском ишемической болезни сердца и смертностью [28], физическая нагрузка может быть полезна при постоянном незначительном воспалении.

Т а б л и ц а 1. Гематологические показатели периферической крови крыс линии SHR и WKY в условиях физической нагрузки (3 сентября и 26 ноября) ($\bar{X} \pm Sx, n = 6$)

Показатель	WKY		SHR	
	Контроль	Физическая нагрузка	Контроль	Физическая нагрузка
<i>Сентябрь</i>				
Количество лейкоцитов, $10^9/\text{л}$	$10,63 \pm 0,66$	$9,31 \pm 0,38, 12 \%$	$13,80 \pm 0,77$	$8,56 \pm 0,82^{**}, 38 \%$
Количество лимфоцитов, $10^9/\text{л}$	$5,54 \pm 0,51$	$4,69 \pm 0,27, 15 \%$	$8,45 \pm 0,84$	$4,87 \pm 0,57^{**}, 42 \%$
Количество моноцитов, $10^9/\text{л}$	$0,29 \pm 0,19$	$0,11 \pm 0,04, 62 \%$	$0,61 \pm 0,18$	$0,27 \pm 0,09, 56 \%$
Количество гранулоцитов, $10^9/\text{л}$	$4,82 \pm 0,59$	$4,51 \pm 0,24, 6 \%$	$4,79 \pm 0,48$	$3,44 \pm 0,81, 28 \%$
Количество эритроцитов, $10^{12}/\text{л}$	$8,37 \pm 0,69$	$7,67 \pm 0,42, 8 \%$	$8,95 \pm 0,78$	$6,76 \pm 0,58^*, 24 \%$
Гемоглобин, г/л	$110,60 \pm 8,42$	$100,00 \pm 0,58, 10 \%$	$118,83 \pm 10,35$	$93,20 \pm 5,59, 22 \%$
<i>Ноябрь</i>				
Количество лейкоцитов, $10^9/\text{л}$	$19,67 \pm 0,80$	$18,17 \pm 1,90, 8 \%$	$17,53 \pm 0,84$	$14,89 \pm 2,93, 15 \%$
Количество лимфоцитов, $10^9/\text{л}$	$11,78 \pm 0,50$	$10,22 \pm 1,03, 13 \%$	$13,07 \pm 0,58$	$10,91 \pm 1,58, 17 \%$
Количество моноцитов, $10^9/\text{л}$	$0,51 \pm 0,21$	$0,38 \pm 0,08, 25 \%$	$0,88 \pm 0,08$	$0,93 \pm 0,17, 6 \%$
Количество гранулоцитов, $10^9/\text{л}$	$7,38 \pm 0,69$	$7,87 \pm 1,36, 7 \%$	$3,73 \pm 0,54$	$3,82 \pm 0,42, 2 \%$
Количество эритроцитов, $10^{12}/\text{л}$	$14,48 \pm 0,67$	$11,73 \pm 1,25, 19 \%$	$14,45 \pm 0,40$	$13,88 \pm 1,57, 4 \%$
Гемоглобин, г/л	$206,00 \pm 9,38$	$167,50 \pm 18,31, 19 \%$	$211,00 \pm 6,53$	$202,00 \pm 23,72, 4 \%$

П р и м е ч а н и я: * – сравнение с контролем, $p < 0,05$; ** – $p < 0,001$; t -критерий Стьюдента.

Несмотря на то что снижение общей концентрации лейкоцитов типично после продолжительных и/или интенсивных нагрузок [27; 29; 30], механизмы возникновения лейкопении, вызванной физическими упражнениями, не вполне изучены [29]. Возможно, физическая нагрузка воздействует на миграцию лейкоцитов между вторичными лимфоидными органами и кровотоком. Вероятность того, что физическая нагрузка непосредственно воздействует на гемопоэз в костном мозге и таким образом вызывает изменения количества лейкоцитов в крови, требует дальнейших исследований. Известно, что изменения в уровне кортикостероидов и катехоламинов после физической нагрузки играют главную роль в характерном изменении процентного соотношения основных субпопуляций лейкоцитов [31; 32], включая лейкоцитоз [33] и лейкопению [30]. Проведенные

исследования указывают на то, что концентрации глюкокортикоидов после субмаксимальной нагрузки достаточны для того, чтобы стимулировать апоптоз [34]. Данные наблюдения подтверждают предположение о взаимосвязи между апоптозом, вызванным нагрузкой, и лимфопенией [30]. В ответ на клеточные стресс-факторы, являющиеся одной из причин повреждения ДНК, апоптоз предотвращает распространение дефектных клеток и сохраняет стабильность генома [34]. Установлено, что особенно изнуряющие продолжительные нагрузки сопровождаются как системной воспалительной реакцией [30; 33; 35; 36], так и повреждением ДНК [7–10; 12]. Повреждения ДНК в клетках периферической крови в основном являются результатом увеличения выработки активных форм кислорода и азота во время и после энергичных аэробных тренировок [10; 13]. Помимо окислительного стресса такие факторы, как метаболический, гормональный и термический стресс, вдобавок к ультраструктурным повреждениям мышечных волокон, являются типичными реакциями на продолжительную интенсивную физическую нагрузку, что может приводить к высвобождению цитокинов, белков острой фазы воспаления и активации или ингибированию отдельных линий системы клеточного иммунитета [35; 37]. Однако гипотеза о связи апоптоза и лейкопении была опровергнута несколькими исследователями, которые посчитали, что апоптоз недостаточно сильно выражен у подвергавшихся интенсивной нагрузке особей, чтобы влиять на количество лейкоцитов [38; 39]. Также было отмечено, что лейкоциты, покинувшие систему кровообращения в течение 2 ч после упражнений, не были апоптотическими [40]. Таким образом, ряд исследователей рассматривают не апоптоз как главную причину лейкопении после физической нагрузки, а другие механизмы: возможное перераспределение лимфоцитов и/или нехватку созревших клеток, которые могут выйти в кровоток.

Дальнейший анализ полученных нами данных показывает увеличение апоптотических клеток в каждой группе животных, подвергавшихся физической нагрузке (табл. 2). В группе крыс линии WKY, изученной в ноябре, разница между показателями была статистически значимой. Данные световой микроскопии (табл. 3) также указывают на увеличенный уровень гибели иммунокомпетентных клеток на 60 % у группы крыс линии WKY, подвергавшейся физической нагрузке.

В целом под воздействием физической нагрузки у животных уровень апоптотических клеток увеличивается не настолько, чтобы объяснить лейкопению, что согласуется с данными исследования [40]. Неожиданным является то, что у крыс линии WKY под действием тренировок уровень клеточной смерти значительно возрастает, тогда как клетки животных линии SHR оказались менее чувствительны. Возможно, это объясняется сниженной способностью диплоидных клеток с изменениями хромосомного состава вступать в апоптоз. Анеуплоидия может вести к отсутствию пунктов контроля пролиферации и соответственно нарушению механизмов гибели клеток. Появились данные, что если анеуплоидные сестринские клетки, образовавшиеся в результате многополюсного митоза, подвергаться апоптотическому воздействию, погибнет лишь часть таких клеток,

а часть останется жизнеспособными [41]. Данное предположение базируется на том, что у животных линии SHR по сравнению с крысами линии WKY наблюдается значительно повышенный уровень хромосомных повреждений и аномальных метафаз [4; 6]. Также у крыс линии SHR, изученных нами в ноябре, обнаружено статистически больше клеток в стадии G1/G0 (табл. 2). Стадия G0, или клеточный арест, является альтернативой апоптозу при попытке предотвратить размножение клеток с поврежденной ДНК [42].

Т а б л и ц а 2. Влияние физической нагрузки на молекулярно-биологические показатели периферической крови крыс линии SHR и WKY ($X \pm Sx$, $n = 6$, U -критерия Манна–Уитни)

Условия	WKY		SHR	
	Контроль	Физическая нагрузка	Контроль	Физическая нагрузка
	1	2	3	4
<i>Сентябрь</i>				
Апоптоз, %	8,24 ± 1,98	9,16 ± 1,54	12,41 ± 1,90	12,69 ± 2,58
G1/G0, %	73,39 ± 7,52	85,42 ± 5,87	72,58 ± 2,09	73,74 ± 7,48
S, %	24,40 ± 7,09	12,12 ± 6,49	24,18 ± 0,91	26,24 ± 7,48
G2/M, %	2,21 ± 2,36	2,46 ± 2,46	3,24 ± 2,74	0,02 ± 0,04
Микроядра, %	1,90 ± 0,38	2,35 ± 1,08	1,98 ± 0,85	2,37 ± 0,79
<i>Ноябрь</i>				
Апоптоз, %	8,72 ± 0,27	10,46 ± 0,64, $p_{1-2} < 0,05$	7,70 ± 0,80	8,83 ± 1,42
G1/G0, %	92,41 ± 1,29	90,45 ± 1,2	96,71 ± 0,63, $p_{1-3} < 0,05$	95,04 ± 0,46, $p_{2-4} < 0,05$
S, %	6,85 ± 1,40	9,47 ± 1,16	2,46 ± 0,82	4,61 ± 0,44, $p_{2-4} < 0,05$
G2/M, %	0,74 ± 0,74	0,08 ± 0,08	0,83 ± 0,39	0,36 ± 0,24
Микроядра, %	8,3 ± 1,13	10,27 ± 1,48	4,55 ± 0,6, $p_{1-3} < 0,05$	5,77 ± 1,08, $p_{2-4} < 0,05$

Т а б л и ц а 3. Гибель лейкоцитов периферической крови крыс линии SHR и WKY в условиях физической нагрузки (ноябрь) и инкубации цельной крови при 4 °C в течение 24 ч ($X \pm Sd$, $n = 6$, U -критерия Манна–Уитни)

Группа животных	Кровь после забора, гибель лейкоцитов, %	Кровь инкубировалась при 4 °C 24 ч, гибель лейкоцитов, %
	5	6
1. SHR контроль	2,8 ± 1,64	3,67 ± 2,34
2. SHR физическая нагрузка	2,67 ± 0,82	11 ± 6,48, $p_{1-2} < 0,05$, $p_{5-6} < 0,05$
3. WKY контроль	0,83 ± 0,98, $p_{1-3} < 0,05$	10,83 ± 5,04, $p_{1-3} < 0,05$, $p_{5-6} < 0,05$
4. WKY физическая нагрузка	1,33 ± 1,5	4,75 ± 1,5, $p_{3-4} < 0,05$, $p_{5-6} < 0,05$

В целом выбранный нами режим физических нагрузок особенно не повлиял на молекулярно-биологические параметры крыс, однако в сентябре некоторое угнетение процессов пролиферации отмечается по маркерному увеличению числа клеток на стадии покоя (G1/G0) у крыс линии WKY. Различия между группами недостоверны и колеблются в физиологических рамках ответа на стрессорную ситуацию. В ноябре в целом наблюдали усиление процессов пролиферации кле-

ток в организме животных, получавших физическую нагрузку, результатом чего явилось увеличение в периферической крови числа клеток на стадии синтеза ДНК (стадия S) и уменьшения клеток на стадии G1/G0 (табл. 2).

Таким образом, полученные результаты соответствуют мнению некоторых авторов, утверждающих, что физическая активность, достигнув определенной интенсивности, оказывает иммуноподавляющее действие [7; 42]. Эффект особенно сказывается на больных животных с нарушениями иммунного статуса. В первую очередь об этом говорит пониженный уровень лейкоцитов в экспериментальных группах. Физические нагрузки вызвали незначительное усиление гибели иммунокомпетентных клеток во всех опытных группах, с достоверным увеличением уровня апоптоза у крыс линии WKY в ноябре. По данным литературных источников, достоверно значимая гибель лейкоцитов периферической крови здоровых людей в условиях интенсивной нагрузки происходит уже на 3–4-й день эксперимента [7]. Можно предположить, что нагрузка не достигала интенсивности, которая приводила бы к значительному усилению гибели клеток во всех группах животных, или клетки в стадии покоя, которых больше у крыс линии SHR, не могут подвергаться апоптозу при повреждающих факторах.

Время года. Односторонний дисперсионный анализ Краскела–Уоллиса показал, что все изученные молекулярно-биологические параметры периферической крови крыс значительно колеблются на протяжении года у животных обеих линий, за исключением клеток на стадии G2/M у SHR и WKY, а также лейкоцитов с микроядрами у крыс SHR (рис. 1). У крыс линии SHR процент апоптоза достигает пика $13,69 \pm 2,08$ % и $12,41 \pm 1,90$ % 2 раза в год в конце апреля и в начале сентября. Причем, тогда как у крыс линии WKY уровень апоптоза одинаково низок и стабилен и в апреле, и в мае, у крыс линии SHR процент погибших лейкоцитов достоверно снижается на 64 % и в мае не отличается от показателя крыс линии WKY. В начале сентября у крыс линии SHR уровень апоптоза снова достоверно увеличивается и затем незначительно снижается к концу ноября. У крыс линии WKY процент погибших клеток незначительно увеличивается к осени.

Пролиферация лейкоцитов у животных обеих линий SHR и WKY увеличена в начале сентября, о чем говорит достоверное увеличение числа клеток на стадии синтеза S и уменьшение клеток на стадии G1/G0, к ноябрю показатели возвращаются к предыдущим значениям. Микроядра в лейкоцитах периферической крови крыс WKY в ноябре встречались, по меньшей мере, в 2 раза чаще, чем в любое другое время года, достигая $8,3 \pm 1,13$ %, тогда как для гипертензивных животных уровень микроядер составлял $4,55 \pm 0,6$ %.

Полученные данные могут свидетельствовать о более гибкой и пластичной реакции крыс линии WKY по сравнению с крысами SHR на смену сезонов года. Сезонные изменения у больных сердечно-сосудистыми заболеваниями были зарегистрированы во многих исследованиях. Среди больных обнаружена тенденция к осложнениям и обострениям в зимнее время года и ослаблению симптомов заболеваний летом [43; 44]. Например, зимой отмечается увеличение случаев

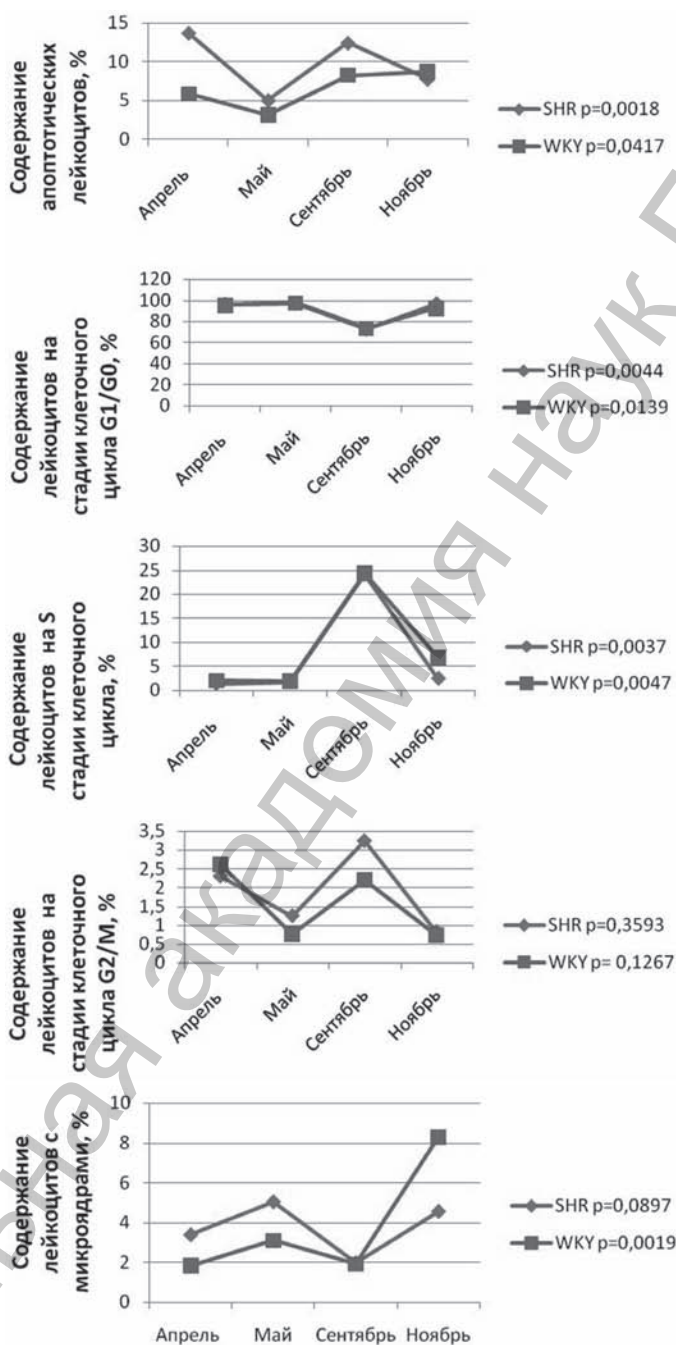


Рис. 1. Влияние времени года на молекулярно-биологические показатели периферической крови крыс линий SHR и WKY ($X \pm Sx$, $n = 6$, односторонний дисперсионный анализ Краскела–Уоллиса)

острого инфаркта миокарда на 53 % по сравнению с летними месяцами [44], также возрастает частота инсультов у больных с фибрилляцией предсердий [45]. Известно о высокой чувствительности и больных АГ к изменению погодных факторов [46]. Сезонные колебания артериального давления являются одним из наиболее важных факторов, способствующих увеличенной частоте осложнений сердечно-сосудистых заболеваний в холодное время года. Изменения кровяного давления были зарегистрированы в популяции людей с нормальным кровяным давлением [47; 48] и у больных артериальной гипертензией [49–51] с пиком зимой и наименьшими показателями летом. Показано, что во время экспозиции на холоде увеличивается количество эритроцитов, тромбоцитов в крови, что повышает ее вязкость, активируется симпатическая система, что несомненно влияет на организм и его функциональность [52; 53]. Однако авторы, изучающие влияние смены сезонов года на людей с АГ, отмечают, что даже у больных, ведущих одинаковый образ жизни круглый год, в основном пребывавших в помещении со стабильной температурой и с минимальной экспозицией на свежем воздухе, давление остается повышенным в более холодное время года [54]. Реакция крыс гипертензивной линии SHR на смену сезонов года в условиях вивария ранее не изучалась. Однако при изучении повреждений и репарации ДНК крысы линии Wistar оказались наиболее чувствительны к повреждающему эффекту канцерогена на ДНК в зимнее время по сравнению с летним [15]. Показано, что температура окружающей среды влияет на уровень глюкокортикоидов, а те, в свою очередь, на активность супероксиддисмутазы у животных, включая лабораторных крыс, содержащихся в помещении без температурного контроля. В жаркий период окислительный стресс у крыс Wistar усиливался по сравнению с холодным временем года [55]. Полученные результаты подтверждают необходимость учитывать циркадные ритмы иммунной системы при лечении больных с артериальной гипертензией. При назначении лекарств может оказаться предпочтительней варьировать дозу лекарства или назначать дополнительные средства в период ослабления иммунной системы больных.

Инкубация крови при 4 °С. Цитологический анализ мазков крови показал, что инкубация образцов крови животных при температуре 4 °С в течение 24 ч вызвала увеличение числа клеток, подвергшихся апоптотическим изменениям. При этом во всех группах, кроме контрольной группы крыс линии SHR, разница была достоверной (табл. 3). При анализе учитывали такие нарушения морфологии лейкоцитов, как конденсация хроматина или кариопикноз, мембранный блеббинг (клазматоз), кариорексис, двухъядерные клетки, клетки с микроядрами, гиперсегментированные нейтрофилы, кариолизис или клетки в виде «теней». В результате микроскопического анализа установлено, что патологические формы лейкоцитов в основном представлены гиперсегментированными нейтрофилами (рис. 2, б), мембранным блеббингом (рис. 2, в) и преобладали клетки в виде «теней» – 64,4 % среди всех клеток с нарушенной морфологией крыс линии WKY и 60,2 % среди

лейкоцитов крыс SHR (рис. 2, з). Патологическую морфологию лейкоцитов крови после инкубации наблюдали примерно одинаково часто у здоровых и гипертензивных животных – $8,42 \pm 1,47 \%$ и $7,33 \pm 1,74 \%$ (объединенные данные крыс, подвергавшихся и не подвергавшихся физической нагрузке, $X \pm Sx$, $p \geq 0,05$). Данные указывают на то, что время хранения цельной крови при 4°C довольно ограничено, так как увеличивается гибель лейкоцитов путем апоптоза и некроза. Результаты согласуются с исследованиями из [56], в которых количество нейтрофилов, подвергавшихся апоптозу и некрозу, росло с увеличением времени инкубации при 4°C . В целом хорошо известно, что инкубация цельной крови при 4°C негативно сказывается на жизнеспособности клеток [56–58].

Анализ мазков крови также показал, что относительное содержание апоптотических клеток у крыс линии SHR достоверно выше их количества в крови крыс линии WKY ($p < 0,05$) (табл. 3). Так, число апоптотических клеток в контрольной группе крыс на 76 % меньше, чем у гипертензивных животных. Полученные нами результаты соответствуют данным других авторов об усиленной гибели лейкоцитов у больных с АГ [2].

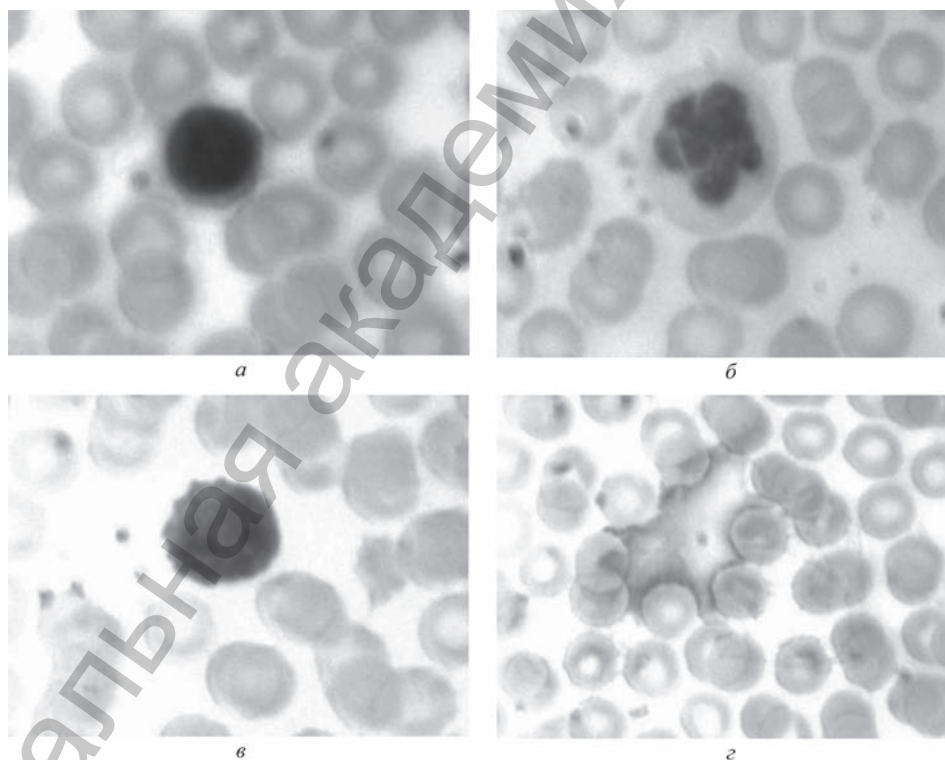


Рис 2. Морфологические признаки гибели лейкоцитов периферической крови (окуляр $\times 10$, объектив $\times 100$; окраска по Романовскому–Гимза): а – лейкоцит (норма); б – гиперсегментированный нейтрофил (свыше 5 сегментов); в – мембранный блеббинг лейкоцита; г – клетка – «тень»

Заключение. Установлено, что иммунная система крыс линии SHR более остро реагирует на физические нагрузки и смену сезонов года, чем крыс линии WKY. Изнурительная физическая нагрузка отрицательно сказывается на количестве лейкоцитов в крови животных, оказывая иммуноподавляющее действие. При этом в экспериментальных группах линии SHR уровень лейкоцитов снижается гораздо интенсивнее по сравнению с контролем. Наиболее уязвимыми лейкоциты периферической крови крыс линии SHR оказались в апреле и сентябре, когда уровень апоптотических клеток был значительно выше, чем в другой сезон наблюдения. Время хранения цельной крови перед исследованием морфологии лейкоцитов следует ограничить, так как значительно увеличивается гибель иммунокомпетентных клеток путем апоптоза и некроза. Следует отметить, что лейкоциты изучаемых линий животных отличаются своей реакцией на неблагоприятные факторы не целиком, а только в отдельных механизмах гибели и дифференцировки, что неудивительно, так как линия SHR создана на основе линии WKY. В результате впервые показаны различия в динамике процесса кроветворения у изучаемых линий животных, отмечено возможное наличие признаков его неэффективности у крыс линии SHR, что выражается в высокой чувствительности лейкоцитов к индукции гибели *in vivo*.

Таким образом, комплексное использование гематологических и молекулярно-биологических параметров в динамике позволяет более полно описывать имеющиеся тест-объекты, что может повысить их чувствительность при изучении эффективности и безопасности различных веществ в научных и доклинических исследованиях.

Работа выполнена при поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант № Б11М-109).

Литература

1. Pero R. W., Bryngelsson C., Mitelman F. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1976. Vol. 73, N 7. P. 2496–2500.
2. Thukral K., Sharma R., Chandey M., Gandhi G. // Int. J. Hum. Gen. 2012. Vol. 12, N 2. P. 105–111.
3. Negishi H., Ikeda K., Kuga S. et al. // J. Hypertens. 2001. Vol. 19, N 3, Pt. 2. P. 529–533.
4. Negishi H., Njelekela M., Ikeda K. et al. // Hypertens Res. 2000. Vol. 23, N 3. P. 285–289.
5. Rao K. S. // Indian J. Biochem. Biophys. 2009. Vol. 46. P. 9–15.
6. Almeida M. R., de Oliveira Lima E., da Silva V. J. et al. // Mutat. Res. 2008. Vol. 657, N 2. P. 155–159.
7. Hsu T. G., Hsu K. M., Kong C. W. et al. // Med. Sci. Sports Exerc. 2002. Vol. 34, N 3. P. 438–442.
8. Abd Hamid N. A., Hasrul M. A., Ruzanna R. J. et al. // Nutr. J. 2011. Vol. 10, art. N 37. P. 1–7.
9. Mastaloudis A., Yu T. W., O'Donnell R. P. et al. // Radic. Biol. Med. 2004. Vol. 36. P. 966–975.
10. Poulsen H. E., Weimann A., Loft S. // Proc. Nutr. Soc. 1999. Vol. 58. P. 1007–1014.
11. Reichhold S., Neubauer O., Ehrlich V. et al. // Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 2008. Vol. 17. P. 1913–1919.
12. Tsai K., Hsu T. G., Hsu K. M. et al. // Radic. Biol. Med. 2001. Vol. 31. P. 1465–1472.
13. Neubauer O., Reichhold S., Nersesyan A. et al. // Exerc. Immunol. Rev. 2008. Vol. 14. P. 51–72.
14. Narayanan S., O'Donovan M. R., Duthie S. J. // Mutagenesis. 2001. Vol. 16, N 6. P. 455–459.

15. Ziliani S., Presta M., Mazzocchi C. et al. // *Cancer Lett.* 1984. Vol. 23, N 3. P. 245–251.
16. Фрид С. А., Карпов А. А., Туктарова И. А., Курчатова Н. Н. // *Рос. кардиолог. журн.* 2008. № 3. С. 22–26.
17. Lim H. H., DeLano F. A., Schmid-Schönbein G. W. // *J. Vasc. Res.* 2001. Vol. 38. P. 228–236.
18. Roos W. P., Kaina B. // *Trends Mol. Med.* 2006. Vol. 12, N 9. P. 440–450.
19. Sun M., Zhou T., Jonasch E., Jope R. S. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2013. Vol. 1833, N 6. P. 1489–1497.
20. Cao F., Zhou T., Simpson D. et al. // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2007. Vol. 218, N 2. P. 174–185.
21. Fenech M., Kirsch-Volders M., Natarajan A. T. et al. // *Mutagenesis.* 2011. Vol. 26, N 1. P. 125–132.
22. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / под общ. ред. П. У. Хабриева. М., 2005. С. 49.
23. Гацура В. В. Методы первичного фармакологического исследования биологически активных веществ. М.: Медицина, 1974. С. 143.
24. Mooren F. C., Völers K. *Molecular and Cellular Exercise Physiology.* Champaign, IL: Human Kinetics, 2005. P. 321–329.
25. Nieman D. C., Miller A. R., Henson D. A. // *Int. J. Sports Med.* 1994. Vol. 15, N 4. P. 199–206.
26. Walsh N. P., Gleeson M., Shephard R. J. et al. // *Exerc. Immunol. Rev.* 2011. Vol. 17. P. 6–63.
27. Johannsen N. M., Swift D. L., Johnson W. D. et al. // *PLoS ONE.* 2012. Vol. 7, N 2. P. e31319.
28. Brown D. W., Giles W. H., Croft J. B. // *J. Clin. Epidemiol.* 2001. Vol. 54. P. 316–322.
29. Malm C. // *Sports Med.* 2004. Vol. 34. P. 555–566.
30. Pedersen B. K., Hoffman-Goetz L. // *Physiol. Rev.* 2000. Vol. 80. P. 1055–1081.
31. Gleeson M. // *J. Appl. Physiol.* 2007. Vol. 103. P. 693–699.
32. Nagatomi R. // *Exerc. Immunol. Rev.* 2006. Vol. 12. P. 54–71.
33. Neubauer O., König D., Wagner K. H. // *Eur. J. Appl. Physiol.* 2008. Vol. 104. P. 417–426.
34. Hoffman-Goetz L., Zajchowski S. // *J. Sports Med. Phys. Fitness.* 1999. Vol. 39. P. 269–274.
35. Fehrenbach E., Schneider M. E. // *Sports Med.* 2006. Vol. 36. P. 373–384.
36. Suzuki K., Nakaji S., Yamada M. et al. // *Med. Sci. Sports Exerc.* 2003. Vol. 35. P. 348–355.
37. König D., Wagner K. H., Elmadfa I., Berg A. // *Exerc. Immunol. Rev.* 2001. Vol. 7. P. 108–133.
38. Mooren F. C., Bloming D., Lechtermann A. et al. // *J. Appl. Physiol.* 2002. Vol. 93. P. 147–153.
39. Mooren F. C., Lechtermann A., Volker K. // *Med. Sci. Sports Exerc.* 2004. Vol. 36. P. 1476–1483.
40. Steensberg A., Morrow J., Toft A. D. et al. // *Eur. J. Appl. Physiol.* 2002. Vol. 87. P. 38–42.
41. Онищенко Г. Е., Александрова Е. // *Докл. РАН.* 2004. Т. 399. С. 507–509.
42. Liu B., Chen Y., Clair D. K. // *Radic. Biol. Med.* 2008. Vol. 44. P. 1529–1535.
43. Mooren F. C., Völers K. *Molecular and Cellular Exercise Physiology.* Champaign, IL: Human Kinetics, 2005. P. 321–329.
44. Spencer F. A., Goldberg R. J., Becker R. C., Gore J. M. // *J. Am. Coll. Cardiol.* 1998. Vol. 31. P. 1226–1233.
45. Christensen A. L., Rasmussen L. H., Baker M. et al. // *BMJ Open.* 2012. Vol. 2. P. e001210.
46. Заславская Р. М., Щербань Э. А., Логвиненко С. И. // *Научн. ведом. БелГУ. Сер. Медицина. Фармация.* 2010. № 4. С. 41–46.
47. Hayashi T., Ohshige K., Sawai A. et al. // *Hypertension Research.* 2008. Vol. 31. P. 569–574.
48. Jansen P. M., Leineweber M. J., Thien T. // *J. Hum. Hypertens.* 2001. Vol. 15. P. 113–117.
49. Gideon C., Rabinovich P. D., Weintraub M. // *Gerontology.* 2004. Vol. 50. P. 315–321.
50. Hata T., Ogiwara T., Maruyama A. et al. // *Clinical and Experimental Hypertension.* 1982. Vol. 4, N 3. P. 341–354.
51. Abdulla K., Taka M. // *Postgraduate Medical Journal.* 1988. Vol. 64, N 747. P. 23–26.
52. Woodhouse P. R., Khaw K. T., Plummer M. et al. // *Lancet.* 1994. Vol. 343. P. 435–439.
53. Keatinge W. R., Coleshaw S. R., Cotter F. et al. // *Br. Med. J (Clin. Res. Ed.).* 1984. Vol. 289, N 6456. P. 1405–1408.
54. Fujiwara T., Kawamura M., Nakajima J. et al. // *J. Hypertens.* 1995. Vol. 13, N 12, Pt. 2. P. 1747–1752.

55. Bhat S., Rao G., Murthy D., Gopalakrishna P. // Indian J. Clin. Biochem. 2008. Vol. 23, N 2. P. 191–194.
56. Sláma P., Sládek Z., Rysánek D. // Gen. Physiol. Biophys. 2007. Vol. 26, N 2. P. 118–125.
57. Bergman M., Bessler H., Salman H., Djaldetti M. // Int. J. Hematol. 2003. Vol. 77, N 4. P. 351–353.
58. Ashmore L. M., Shopp G. M., Edwards B. S. // J. Immunol. Methods. 1989. Vol. 118. P. 209–215.

O. O. PAVLYUSHCHIK, I. A. ZHUKOVA, I. S. DARAFEYENKA,
T. V. CHUKARINA, V. Yu. AFONIN

**INFLUENCE OF GENETIC AND ENVIRONMENTAL FACTORS
ON BLOOD PARAMETERS UNDER HEREDITARY PREDISPOSITION
TO ARTERIAL HYPERTENSION**

Summary

Molecular and hematologic characteristics of peripheral blood in SHR and WKY under simultaneous emotional and physical stress were studied. Also, we assessed seasonal variations of leucocyte proliferation and apoptosis in rats and influence on these parameters of the whole blood incubation at 4 °C for 24 hours. In order to assess characteristics of peripheral blood we used hematology analyzer, leucocyte molecular and biological parameters were evaluated by a flow cytometer. Negative influence of the intense prolonged exercises on the hematologic characteristics of the animal blood was noted. There was a significant fall of the number of immune cells in peripheral blood of the rats and intensification of leucocyte apoptosis, particularly in SHR. The parameters varied significantly during the year indicating more flexible reaction of WKY on seasonal changes. Light microscopy showed that incubation of the whole blood made rat leucocytes considerably liable to apoptotic changes.

УДК 572.12;572.15;547

А. Э. САЛЕМ, М. В. ШОЛУХ

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ АСПАРТАТ АМИНОТРАНСФЕРАЗЫ С НАНОЧАСТИЦАМИ КОЛЛОИДНОГО ЗОЛОТА

Белорусский государственный университет

(Поступила в редакцию 23.07.2014)

При добавлении мАспАТ к раствору наночастиц коллоидного золота (НЧЗ) происходит сдвиг максимума поглощения раствора в длинноволновую область спектра, что указывает на взаимодействие фермента с НЧЗ. Данный процесс сопровождается агрегацией образовавшихся комплексов. Заполнение всех центров связывания мАспАТ на НЧЗ достигается при концентрации мАспАТ 10 мкг/мл. Взаимодействие мАспАТ с НЧЗ сопровождается значительным снижением ферментативной активности, которая полностью восстанавливается при увеличении концентрации в среде фосфатного буфера до 50 ммоль/л. На основании полученных результатов можно заключить, что характер взаимодействия мАспАТ с НЧЗ носит в основном электростатическую природу.

Наночастицы коллоидного золота (НЧЗ) привлекают к себе все возрастающий научный интерес в связи с их расширяющимся биомедицинским применением [1]. При этом особое внимание уделяется изучению взаимодействия различных типов наночастиц (НЧ) с пептидами [2], нуклеиновыми кислотами [3], белками [4], углеводами [5]. В модельных экспериментах исследовалось взаимодействие НЧЗ с цитохромом С [7], альбумином [4; 8], лизоцимом, химотрипсином и другими белками [9]. Показано, что взаимодействие НЧ с белками может приводить к значительным изменениям их вторичной и третичной структуры. Например, при исследовании процесса анфолдинга лизоцима и β -лактоглобулина, адсорбированных на силикатных НЧ, показано, что при адсорбции данных белков на НЧ происходят быстрые конформационные изменения как на уровне их вторичной, так и третичной структур [4]. Наряду со способностью взаимодействовать с широким кругом молекул, НЧЗ, как было показано в [6], могут проявлять каталитические свойства – ингибировать неферментативное гликирование альбумина. Свойства, проявляемые НЧЗ, определяются их размером, составом, площадью поверхности, характером модификации поверхности, составом и кислотностью

среды [10]. Однако информация о действии различных НЧ, в том числе и НЧЗ на олигомерные белки, весьма ограничена. Одним из представителей таких белков является митохондриальный изофермент аспартат аминотрансферазы (мАспАТ, КФ 2.6.1.1), который представляет собой гомодимер с двумя молекулами пиридоксальфосфата в качестве кофермента [11].

Цель работы – изучение возможного взаимодействия НЧ коллоидного золота с мАспАТ и изучение последствий данного взаимодействия на активность олигомерного белка – мАспАТ.

Материалы и методы исследования. Наночастицы коллоидного золота с гидродинамическим радиусом 16–18 нм были синтезированы и любезно предоставлены Н. В. Голубом (Институт биохимии им. А. Н. Баха, РАН, Москва, Россия).

Митохондриальный изофермент аспартат аминотрансферазы выделяли из свиных сердец, как описано ранее [12–14]. Фермент был гомогенен по данным электрофореза в полиакриламидном геле и обладал активностью не менее 190 МЕ.

Возможность взаимодействия мАспАТ с НЧЗ оценивали по изменению спектральных свойств раствора НЧЗ. Для этого, 750 мкл коллоидного раствора НЧЗ с концентрацией 25 мг/л центрифугировали для осаждения наночастиц согласно [15] при 16000 g 30 мин (позже нами было установлено, что для осаждения НЧЗ с гидродинамическим радиусом 16–18 нм достаточным является центрифугирование при 10000 g 27 мин), супернатант удаляли, а к осадку добавляли 500 мкл раствора мАспАТ (9,45 мкг/мл) в 6,25 ммоль/л фосфатном буфере рН 6,80. Спектр снимали через 10 мин при комнатной температуре на спектрофотометре Carry 50 Bio (Varian, Австралия).

Эксперимент по изучению зависимости оптической плотности (ОП) коллоидного раствора НЧЗ от концентрации мАспАТ проводили при 540 нм по следующей схеме: 200 мкл раствора НЧЗ (25 мг/л) центрифугировали при 10000 g 27 мин. Супернатант удаляли. К осадку НЧЗ добавляли 200 мкл мАспАТ (37,80, 18,9, 9,45, 4,725, 2,3625 мкг/мл), в 6,25 ммоль/л фосфатном буфере, рН 6,80, суспендировали и снимали спектр во время инкубации проб, проводимой непосредственно в спектрофотометрических кюветах при комнатной температуре. По спектру определяли ОП при длине волны 540 нм. Для того чтобы установить, каким образом инкубация с НЧЗ отразится на активности фермента, ее определяли в образцах отобранных из проб с возрастающими концентрациями мАспАТ, указанными выше. Перед измерением активности мАспАТ пробы разводили так, чтобы падение ОП за 1 мин при 340 нм не превышало 0,080. Контролем служила проба без наночастиц.

Изучение зависимости активности мАспАТ от длительности инкубации фермента с НЧЗ проводили следующим образом. Раствор НЧЗ с концентрацией золота 25 мг/л разливали по 400 мкл в пластиковые пробирки типа эппендорф и центрифугировали при 10000 g 27 мин для осаждения наночастиц. Супернатант удаляли, а к осадку добавляли 400 мкл 6,25 ммоль/л фосфатного буферного раствора

pH 6,80, содержащего мАспАТ: 1 – 5 мкг/мл, 2 – 20 мкг/мл, 3 – 80 мкг/мл. Для измерения ферментативной активности пробы отбирали через 2,5, 5, 10, 20, 30 и 40 мин. Активность мАспАТ измеряли сразу же после отбора и соответствующего разведения пробы спектрофотометрическим методом [16], как описано нами ранее [13; 14]. Определение белка производили согласно [17] или по поглощению при 280 нм, используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин. Для мАспАТ использовали значение $A_{280}^{1\%} = 14,0$ [12].

Каждый эксперимент проводили не менее чем в трех независимых определениях. Результаты представлены как средняя арифметическая плюс/минус стандартная ошибка средней ($X \pm Sx$). Обработку результатов осуществляли с помощью программного обеспечения Excel 2000 и Stadia 6.0.

Результаты и их обсуждение. Как видно на рис. 1, при добавлении мАспАТ к НЧЗ происходит сдвиг максимума поглощения раствора НЧЗ в длинноволновую область спектра, что, по данным [19], указывает на взаимодействие белка с НЧЗ. При этом одновременно возрастает оптическая плотность раствора при 640 нм, что является, по мнению [19], свидетельством агрегации комплексов белка с наночастицами. Коллоидный раствор НЧЗ обладает уникальными спектральными свойствами. Он имеет максимум поглощения при $\lambda = 524\text{--}530$ нм [20]. Такого рода колебания в значении максимума поглощения обусловлены различиями в размерах НЧЗ. При взаимодействии с белками и другими химическими соединениями происходит сдвиг максимума в длинноволновую область спектра [24]. Согласно данным [4], этот сдвиг указывает на увеличение размера наночастиц. Такое увеличение может быть обусловлено взаимодействием НЧЗ с молекулами мАспАТ. Дополнительным подтверждением тому могут служить эксперименты, продемонстрировавшие возможность взаимодействия с НЧЗ белков

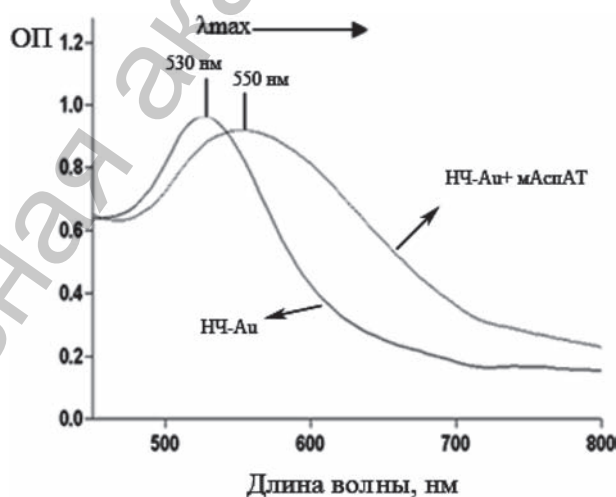


Рис. 1. Влияние мАспАТ на спектральные свойства наночастиц золота; ОП – оптическая плотность

сыворотки крови человека [4] и рекомбинантного белка А [18].

При взаимодействии НЧ с белком происходит покрытие НЧ слоем, состоящим из молекул белка. В сложных белковых смесях может формироваться многослойная структура, получившая термин «корона» [22; 26]. При увеличении концентрации мАспАТ в растворе с фиксированной концентрацией НЧЗ наблюдается (рис. 2) снижение оптической плотности раствора НЧЗ при 540 нм, которое стабилизируется при достижении концентрации мАспАТ около 10 мкг/мл. Таким образом, при данной концентрации фермента имеет место заполнение, по всей видимости, всех центров связывания на НЧЗ и дальнейшее повышение концентрации мАспАТ влияния на регистрируемый параметр не оказывает. Вместе с тем активность фермента повышается вплоть до достижения концентрации мАспАТ 20 мкг/мл. Сравнение динамики взаимодействия НЧЗ и мАспАТ (рис. 2) и изменение активности фермента при этом взаимодействии (рис. 3) выявляет значительные различия в течении этих процессов. В то время как взаимодействие мАспАТ с НЧЗ, регистрируемое при 530 нм, достигало максимума уже при концентрации белка 9,45 мкг/мл, прирост активности продолжался вплоть до концентрации фермента около 20 мкг/мл. Дальнейшее увеличение содержания мАспАТ в пробе давало совершенно незначительный прирост активности. По всей видимости, при малой концентрации белка имеет место низкая конкуренция молекул за центры связывания, что обеспечивает протекание процесса многоточечного связывания мАспАТ с НЧЗ, приводящего к значительным конформационным изменениям белковой глобулы фермент и, как следствие, к значительным потерям каталитической активности. Аналогичные результаты были получены при изучении механизмов взаимодействия мАспАТ с наночастицами Fe_3O_4 [14]. При

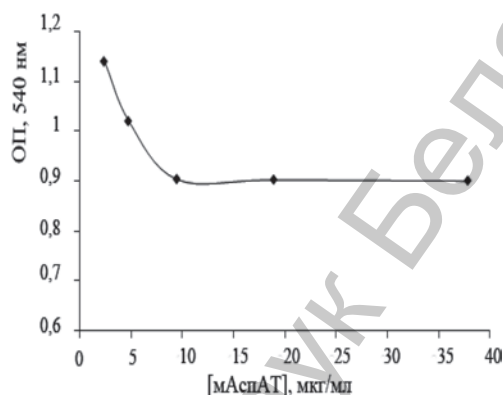


Рис. 2. Зависимость оптической плотности коллоидного раствора НЧЗ при 540 нм от концентрации мАспАТ. Продолжительность инкубации НЧЗ с мАспАТ – 40 мин. Концентрация НЧЗ в пробах – 25 мкг/мл. Содержание мАспАТ в пробах: 37,8, 18,9, 9,45, 4,725, 2,3625 мкг/мл. Среда инкубации – 6,25 ммоль/л фосфатный буфер, pH 6,80. Каждая точка является средней трех независимых измерений

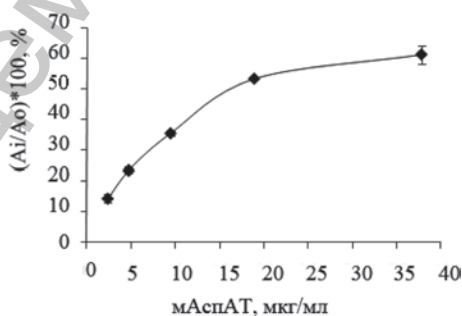


Рис. 3. Зависимость активности мАспАТ от содержания фермента в пробе при постоянной концентрации НЧЗ. Контролем (A_0) служила активность в пробе без наночастиц; A_i – активность мАспАТ в опытной пробе. Каждая точка является средней пяти независимых определений

относительно высоких концентрациях фермента его плотность над активной поверхностью НЧЗ возрастает и для связывания оказывается доступным гораздо меньшее количество сайтов, что, вероятно, сохраняет более нативную конформацию мАспАТ и, как следствие, более высокую активность. Данное предположение хорошо согласуется с особенностями структуры мАспАТ, представляющей собой эллипсоид вращения [23]. Взаимодействие таких «белковых эллипсоидов» с НЧЗ, когда длинная ось вращения эллипсоида перпендикулярна радиусу НЧЗ, приведет к связыванию меньшего числа молекул мАспАТ с одной наночастицей, чем в случае с высокой концентрацией фермента в растворе. Можно предположить, что при более высокой концентрации белка молекулы мАспАТ будут выстраиваться над поверхностью НЧЗ и взаимодействовать с последней по принципу «лепестков ромашки», т. е. когда короткая ось вращения эллипсоида будет перпендикулярна радиусу НЧЗ. При такой «упаковке» будет достигнута большая концентрация активных центров мАспАТ на наночастицу и, следовательно, более высокая каталитическая активность.

Известно, что взаимодействие белков с НЧЗ существенно зависит от концентрации солей [25]. В связи с этим нами была изучена зависимость активности мАспАТ от концентрации фосфатного буфера в присутствии НЧЗ. Как показано на рис. 4, активность мАспАТ не зависит от концентрации фосфатного буфера в широком диапазоне концентраций. Вместе с тем внесение НЧЗ в пробу с концентрацией фосфатного буфера 6,25 ммоль/л влечет за собой падение активности фермента почти на 60 %, что свидетельствует о взаимодействии мАспАТ с НЧЗ, приводящем к конформационным изменениям белковой молекулы. Эти

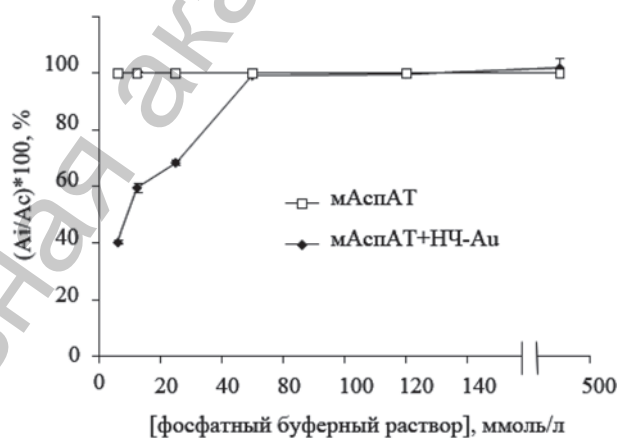


Рис. 4. Влияние концентрации фосфатного буферного раствора на взаимодействие мАспАТ с НЧЗ. Концентрации фосфатного буфера – 6,25, 12,5, 25, 50, 100, 500 ммоль/л, рН 7,0. 400 мкл НЧЗ 25 мкг/мл центрифугировали, удаляли супернатант и осадок ресуспендировали в 400 мкл фосфатного буфера, после чего снимали спектр на спектрофотометре Cary 50 Bio(Varian)

результаты находятся в соответствии с данными [26]. При увеличении концентрации фосфатного буфера активность фермента в пробе начинает возрастать и при достижении концентрации 50 ммоль/л сравнивается с уровнем контроля (рис. 5). Аналогичные результаты были получены при изучении механизмов взаимодействия лизоцима с НЧЗ [27]. Таким образом, на основании полученных результатов можно заключить, что характер взаимодействия мАспАТ с НЧ коллоидного золота носит в основном электростатическую природу.

Работа выполнена в рамках проекта БРФФИ–РФФИ № Б10Р-249.

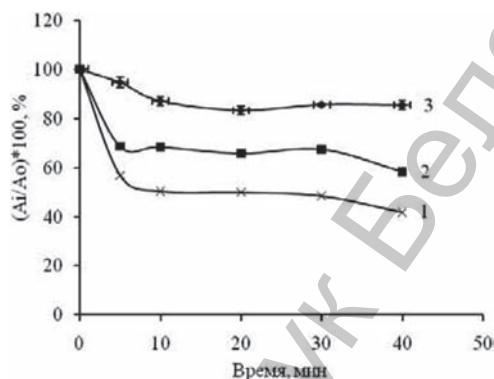


Рис. 5. Зависимость активности мАспАТ от длительности инкубации фермента с НЧЗ. Концентрации мАспАТ: 1 – 5 мкг/мл; 2 – 20 мкг/мл; 3 – 80 мкг/мл. Инкубацию проводили в 6,25 ммоль/л фосфатном буфере рН 6,80. Объем пробы – 400 мкл. Каждая точка является средней пяти независимых определений

Литература

1. Daniel M. C., Astru D. // Chem. Review. 2004. Vol. 104, N 1. P. 293–346.
2. Narayanan R., El-Sayed M. // J. Phys. Chem. B. 2005. Vol. 108, N 26. P. 15332–15333.
3. Shang L., Wang Y. et al. // Langmuir. 2007. Vol. 23, N 14. P. 2714–2721.
4. Silvia H., Park J. J. et al. // Nano. 2010. Vol. 4, N 1. P. 365–379.
5. Cushing B. L., Golub V. O. et al. // Nanotechnology. 2005. Vol. 16, N 9. P. 1701–1706.
6. Senevirante C., Narayanan R. et al. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2012. Vol. 422, N 8. P. 447–454.
7. Mukherjee P., Bhattacharya R. et al. // J. Nanobiotechnol. 2007. Vol. 5, N 4. P. 76–97.
8. Brewer S. H., Glomm W. R. et al. // Langmuir. 2005. Vol. 21, N 21. P. 9303–9307.
9. Yong L., Wai C. // J. Am. Chem. Soc. 2005. Vol. 127. P. 1735–1747.
10. Jana N. R., Gearheart L. et al. // Biochemical and Biophysical Research Communications. 2012. Vol. 422, N 22. P. 447–454.
11. Браунштейн А. Е. и др. // Молекулярная биология. 1977. Т. 11. С. 1238–1257.
12. Darra D., Bossa F. et al. // Eur. J. Biochem. 1976. Vol. 64, N 2. P. 519–526.
13. Golub N. V., Markossian K. A. et al. // Biophysical Chemistry. 2008. Vol. 135, N 1–3. P. 125–131.
14. Салем А. Э., Петрова С. М., Шолух М. В. // Новости медико-биологических наук. 2013. Т. 7, № 2. С. 142–146.
15. Araya E., Olmedo I. et al. // Nanoscale Res. Lett. 2008. Vol. 3, N 11. P. 435–443.
16. Karmen A. A. // J. Clin. Invest. 1955. Vol. 34. P. 131–135.
17. Peterson G. L. // Methods in enzymology. 1983. Vol. 91. P. 95–119.
18. Ko S., Park T. J. et al. // Biosensors and Bioelectronics. 2009. Vol. 24, N 8. P. 2592–2597.
19. Kreibig U., Genzel L. // Surface Science. 1985. Vol. 156, N 3. P. 678–700.
20. Поляновский О. Л. Химия и биология пиридоксалевого катализа. М.: Наука, 1968. С. 100–107.
21. Ghosh D., Sarkar D. et al. // J. of Nanoscience and Nanotechnology. 2011. Vol. 11, N 2. P. 1–6.
22. Sokolov K., Aaron J. et al. // Technol. Cancer Res. Treatment. 2003. Vol. 2, N 6. P. 491–504.
23. Treuel L., Brandholt S. et al. // ACS Nano. 2014. Vol. 8, N 1. P. 503–513.

24. *Xiu Juan S., Dan L.* et al. // *Chin. Sci. Bull.* 2012. Vol. 57, N 10. P. 1109–1115.
25. *Boulos S. P., Davis T. A.* et al. // *J. of American Chemical Society.* 2013. Vol. 29, N 48. P. 14984–14996.
26. *Saptarshi S. R., Duschl A.* et al. // *J. of Nanobiotechnology.* 2013. Vol. 11, N 26. P. 1–12.
27. *Vertegel A. A., Siegel R. W.* et al. // *Langmuir.* 2004. Vol. 20, N 16. P. 6800–6807.

A. E. SALEM, M. V. SHOLUKH

**INTERACTION OF MITOCHONDRIAL ISOENZYME OF ASPARTATE
AMINOTRANSFERASE WITH GOLD COLLOIDAL NANOPARTICLES**

Summary

At addition mAspAT to solution of gold colloidal nanoparticles there is a shift of a maximum of absorption of solution in long-wave area of a range that points to enzyme interaction with gold NP's. This process is accompanied by aggregation of the formed complexes. Filling of all centers of mAspAT binding on gold NP's is reached at mAspAT concentration 10 mkg/ml. Interaction mAspAT with gold NP's is accompanied by considerable decrease in enzyme activity which is completely restored at increase in concentration of the phosphatic buffer to 50 mmol/l. On the basis of the received results it is possible to conclude that nature of mAspAT interaction with colloidal gold has generally the electrostatic nature.

УДК 546.26+577.113

А. С. ЕГОРОВ¹, В. П. ЕГОРОВА², В. И. КРОТ³, Г. В. КРЫЛОВА³, Ф. Ф. ЛАХВИЧ³,
И. В. ЛИПНЕВИЧ³, Т. И. ОРЕХОВСКАЯ⁴, А. А. ВЕЛИГУРА², М. И. ГОВОРОВ¹,
Б. Г. ШУЛИЦКИЙ⁴, В. С. УЛАЩИК¹

ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОЕ И ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКОЕ ДЕТЕКТИРОВАНИЕ ГИБРИДИЗАЦИИ НА КОМПЛЕКСАХ ДНК/УГЛЕРОДНЫЕ НАНОТРУБКИ: SNP-ГЕНОТИПИРОВАНИЕ

¹Институт физиологии НАН Беларуси

²Белорусский государственный педагогический университет

³Белорусский государственный университет

⁴Белорусский государственный университет информатики и радиоэлектроники

⁵Белорусский государственный медицинский университет

(Поступила 23.07.2014)

В работе развивается одно из наиболее актуальных направлений анализа состояний ДНК-содержащих биохимических маркеров – регистрация изменений конформационного состояния однонитчатой (ss) ДНК после адгезии маркеров по изменению оптических, электрохимических свойств слоистых нанобиогетероструктур. Для этого в условиях самосборки синтезированы новые комплексы ssДНК с химически модифицированными малослойными углеродными нанотрубками (мУНТ) нековалентной функционализации. Комплексообразование происходит в процессе электронно-плотной компактификации ДНК на мУНТ. Эффекты УНТ-усиленной компактификации ДНК выявлены методами рамановской и диэлектрической спектроскопии, структурного анализа, гель-электрофореза. Предлагается использовать тонкие пленки из ssДНК/мУНТ-комплексов в качестве сенсорных бионаногетероструктур в емкостных датчиках. Представлены результаты использования этого нового метода генотипирования однонуклеотидного полиморфизма.

Введение. В настоящее время процедура секвенирования (расшифровки) генома человека стала не только возможной, но и доступной, хотя все еще дорогостоящей [1– 6]. Это делает перспективным развитие методов диагностики мутаций генома, накапливаемых за время жизни индивидуума. Хотя уровень мутаций на поколение низок, точечные мутации или однонуклеотидные замены (ОМП – однонуклеотидный полиморфизм; SNP – Single Nucleotide Polymorphism) являются часто встречающимися прижизненными вариациями генома (геном че-

ловека из 25000 генов накапливает порядка 400 мутированных (частота встречаемости более 1 %) [7; 8]. Огромное количество SNP делает их генетическими маркерами для превентивной медицины [8]. Из более чем 10 миллионов выявленных в геноме человека точечных мутаций, несколько тысяч связано с индивидуальной предрасположенностью к заболеваниям, определенным биохимическим профилем, устойчивостью к воздействию окружающей среды (и, в частности, различных лекарственных препаратов) и т. д. [9].

Бионанодетектор изменений в ДНК (генотипирование однонуклеотидного полиморфизма) должен сочетать взаимоисключающие свойства. С одной стороны, олигонуклеотиды должны взаимодействовать с детекторными, высокочувствительными сайтами (т. е. несущими «репортерные» группы) более сильно, чем с неспецифическими молекулярными агентами, а с другой – образовать специфический комплекс с ДНК-мишенями через слабые водородные связи. Значительная часть методов детекции SNP основана на использовании гибридизационных флуоресцентных зондов (олигонуклеотидов с ковалентно связанными репортерными группами: флуоресцирующей и тушащей) [10–16]. Для методов с ковалентной привязкой «репортерных» групп неспецифический вклад в сигнал вносят как искажения конформации ДНК, так и наличие остаточной флуоресценции и неустойчивость к действию внутриклеточных нуклеаз [17]. Это приводит к частичной гибридизации [10–12; 18]. Использование наноструктурированных материалов: наночастиц с золотом, графена, углеродных нанотрубок (УНТ) и других повышает уровень сигнала, но неспецифический вклад все равно остается значительным [13; 14; 19; 20].

Уникальное свойство нуклеотидных оснований – стэкингообразно упорядочиваться на поверхности УНТ, которые, являясь графеноподобным материалом, характеризуются очень слабым рассеянием носителей заряда. Это делает возможным комплексообразование ДНК с УНТ и, соответственно, может быть использовано для решения проблем детектирования SNP [14; 21–29]. Олигонуклеотид с флуоресцеином (FAM – fluorescein phosphoramidites) на одном конце и тушащей флуоресценцию FAM химической группой (например, родамин или УНТ) на другом был предложен в качестве молекулярного сигнализатора (молекулярные «бакены» (molecular beacons)) в [30; 31]. FAM на УНТ используется для детектирования присутствия комплементарных олигонуклеотидов – праймеров полимеразных цепочечных реакций. Три ароматических кольца флуоресцеина из четырех лежат в плоскости, и соответственно, только три кольца могут участвовать в стэкинговом π – π -взаимодействии с поверхностью УНТ как тушителя флуоресценции. Производные флуоресцеина предлагают использовать для детектирования гибридизации одностенных ДНК на поверхности УНТ с точностью до одной некомплементарной пары нуклеотидных оснований включительно [32].

Принцип детектирования заключается в фиксации одностенной ДНК в вытянутом раскрученном состоянии на поверхности одностенной или многостенной углеродной нанотрубки. Отсутствие петель, образованных неспецифи-

ческим спариванием нуклеотидных оснований, с одновременным закреплением флуоресцентно-меченного конца однонитевой ДНК на поверхности УНТ позволяет ДНК взаимодействовать с немеченной однонитевой молекулой ДНК другого состава с образованием дуплекса, характеризующегося максимально высокой степенью спиральности двухнитевой структуры.

Чтобы усилить стэкинг- π - π -взаимодействие между ароматическим флуорофором и УНТ, в работе [33] использовали олигодезоксирибонуклеотид, ковалентно меченный пиренильным флуоресцентным зондом, все четыре ароматических кольца которого, в отличие от FAM, находятся в одной плоскости. Пиренильный флуорофор высвечивает в области 480–500 нм при ультрафиолетовом облучении, а производные флуоресцеина – в области 505–550 нм. Это позволило строго разделить флуоресцентные вклады двух типов флуорофоров. Оказалось, что тушение пиренильного флуорофора одностенными углеродными нанотрубками (ОУНТ) имеет место во всем диапазоне концентраций ОУНТ в отличие от тушения флуоресцеина. В области низких концентраций флуоресцеин-меченных ОУНТ (менее 50 мг/л), увеличение их концентрации приводит к возрастанию интенсивности свечения остатков флуоресцеина. Механизм этого УНТ-усиленного свечения флуоресцеина не выяснен.

Сенсор [32], основанный на явлении УНТ-зависимого тушения флуоресценции флуорофор-меченной однонитевой ДНК, функционирует в области низких концентраций УНТ для минимизации вносимых искажений гибридизационных процессов. Поэтому имеющее место УНТ-зависимое усиление флуоресценции с ростом относительно малого числа молекул УНТ делает проблематичным эффективность использования таких сенсоров. Кроме того, интеркалирование флуорофоров в структуру ДНК влияет на степень гидратации ДНК [34]. Интенсивность свечения ассоциатов флуоресцентно-меченной однонитевой ДНК зависит от наличия в них воды, так как молекулы связанной воды гасят флуоресценцию меченной ДНК. Исследование влияния УНТ на гидратационное тушение свечения нуклеотидов также не проводилось.

В [33] указывалось на возможность самоорганизации пиренильных конъюгатов олигонуклеотидов на поверхности одностенных УНТ как «сворачивание» в электронно-плотную наноструктуру. В этом случае самосборка рассматривалась как побочный эффект, препятствующий молекулярному узнаванию.

Синтез ДНК-содержащих нанобиогетероструктур на основе малодисперсных карбоксилированных синтетических углеродных нанотрубок с небольшим количеством стенок (слоев) (МУНТ) в процессе самосборки может быть одним из путей решения проблемы SNP-генотипирования [21–25; 28; 29]. Нанотехнология Ленгмюра–Блоджетт (ЛБ) позволяет сформировать высокоупорядоченные двумерные (2D) кластеры функционализированных УНТ, которые могут спонтанно поляризоваться в силу локализации заряда, баллистически движущегося по «зигзаг»–УНТ [35; 36].

Установление закономерностей комплексообразования малостенных УНТ с ДНК в кластерах и зависимости природы детектируемого сигнала от ее характеристик позволило бы разработать нанобиотехнологию для генотипирования SNP. В данной работе исследуются самоорганизованные комплексы мУНТ/ДНК, способные к кооперативному связыванию с комплементарными олигонуклеотидными последовательностями.

Цель работы – установить условия высокоэффективного зарядового транспорта и дальнего (резонансного) переноса энергии в наноструктурных комплексах малостенных углеродных нанотрубок с ДНК для реализации эффективной сенсорики ДНК-основанных процессов на поверхности УНТ для генотипирования однонуклеотидных замен.

Материалы и методы исследования. *Реагенты.* Одноцепочечные олигодезоксирибонуклеотиды (праймерные последовательности ssДНК), использованные для проведения исследований, синтезированы на ООО «Праймтех» (Минск, Беларусь) (табл. 1).

Таблица 1. Названия и характеристики олигонуклеотидов

Название олигонуклеотида	Последовательность и тип олигонуклеотида
FAM-ON1	5'-FAM-GCCATATACTCTCCTTGGTGACA-3' (FAM-меченный)
ON1	5'-GCCATATACTCTCCTTGGTGACA-3' (немеченный)
ON2	5'-TGTCACCAAGGAGAGTATATGGC-3' (ON1-комплементарная целевая последовательность)
ON5	5'-TGTCACCAAGGCGAGTATATGGC-3' (ON1-целевая последовательность с одним SNP)
ON3	5'-TGTTACCAAGGCGAGTATAGGGC-3' (ON1-целевая последовательность с тремя SNP)
ON4	5'-GTAGGCTTGGGAATAGTACGA-3' (ON1-некомплементарная целевая последовательность)

Также в качестве нуклеотидных последовательностей использовалась высокоочищенная плацентарная ДНК в концентрации 1,03 мг/мл в буфере 10^{-5} М Na_2CO_3 , содержание РНК и белка $<0,1$ % (отношение оптических плотностей $D_{160} / D_{230} = 2,378$ и $D_{160} / D_{280} = 1,866$ соответственно). Для определения молекулярной массы олигонуклеотидов использовался «ДНК маркер молекулярного веса, М1Кб» (Праймтех, Беларусь), окрашиваемый красителем Zubr Green I (Праймтех, Беларусь).

Максимум поглощения FAM – 495 нм, максимум флуоресценции – 525 нм [32; 33]. Максимум поглощения Zubr Green I – 497 нм, максимум флуоресценции – 520 нм [37]. Флуоресценция Zubr Green I на порядок возрастает при интеркаливании между парами азотистых оснований, когда молекулы флуорофора по-

падают в неполярное окружение. Напротив, свечение FAM активируется при его нахождении в несвязанном состоянии.

Для функционализации мУНТ использовались стеариновая кислота и фосфатидилхолин L- α -Phosphatidylcholine (Sigma, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, 99 %).

Нефункционализированные углеродные нанотрубки формировались методом химического парофазного осаждения (CVD). Затем эти углеродные нанотрубки гидрофилизировались ковалентной модификацией их поверхности карбоксильными группами [38; 39].

Дифильный олигомер производных тиофена (дитионилпиррол, HDTP): 3-гексадецил-2,5-ди(тиофен-2-ил)-1*H*-пиррол [40–42] растворяли в гексане в концентрации $1,0 \cdot 10^{-3}$ М.

Все остальные используемые вещества были класса химически чистых аналитических реактивов.

Гель-электрофорез. В электрофоретических исследованиях использовалась суспензия углеродных нанотрубок, полученная диспергированием мУНТ (от 400 до 600 мг) в 400 мл ТЕ буфера (концентрация мУНТ $c_{\text{мУНТ}} = 1; 1,5; 10$ мг/мл) ультразвуковой обработкой (22 кГц, 10 мин). Для проведения комплексификации FAM-ON1 на мУНТ к 13,5 мкл олигонуклеотида FAM-ON1 в ТЕ буфере ($c = 0,5$ пикоМол/мкл) добавили 100 мкл суспензии нанотрубок различной концентрации в ТЕ-буфере. Реакционную смесь выдерживали в кювете при комнатной температуре или обрабатывали ультразвуком в течение от 1 до 10 мин. Гель-электрофорез проводили в полиакриламидном геле (ПААГ) в 0,5-кратном 0,09 М TBE буфере (pH 8,0) при комнатной температуре в течение 45 мин. Контроль электрических параметров электрофоретической системы, переустанавливаемых по мощности, осуществлялся на аппаратуре Electrophoresis Power Supply EPS 601 (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Швеция). Гель-электрофорез повторялся не менее 3 раз.

Спектральный анализ. Спектральные исследования в ультрафиолетовом и видимом диапазоне проводились с использованием конфокального макрорамановского спектрометра Nanofinder HE (LOTIS-TII, Япония–Беларусь) при лазерном возбуждении на длинах волн 473 и 532 нм. Исходную концентрацию олигонуклеотида определяли по оптической плотности водного раствора, измеренной при 260 нм, на спектрофотометре SOLAR RV-2201 (Беларусь). Эффективность комплексификации оценивали по интенсивности флуоресценции смеси FAM-ON1–мУНТ после облучения ультрафиолетовым светом на длине волны 302 нм (ультрафиолетовое возбуждение) с детектированием излучения красителей на длине волны 500 нм с последующим просмотром и документированием гелей на системе ImageQuant 300 (GE Healthcare, США). Предварительно ДНК-маркер в наборе электрофоретических проб окрашивали помещением этого набора в раствор Zuyt Green I в течение 2 мин, затем отмывали в ТЕ буфере (10 мМоль Трис-HCl; 1 мМоль ЭДТА, pH 8,0).

Электрохимические измерения. В качестве датчика использовалась встречно-штыревая структура из i пар электродов, $i = 1, \dots, N$, расположенных на ситал-

ловой подложке [43–45]. Каждая пара электродов представляла собой электрическую емкость открытого типа. Изоляторный слой электродов создавался двухстадийным анодированием и представлял собой бездефектный пористый оксид алюминия с диаметром пор 10 нм [46]. Все электрохимические измерения проводились с использованием деионизированной, бидистиллированной воды.

Формирование пленок Ленгмюра–Блоджетт. Формирование мономолекулярных слоев (монослоев) и получение пленок по ЛБ-методу осуществлялось при температуре субфазы $-17 \pm 0,5$ °С на автоматизированной установке с контролем осаждения на подложки и с компьютерным интерфейсом. Контроль поверхностного натяжения осуществлялся высокочувствительным резонансным индукционным датчиком. Для получения мономолекулярных слоев раствор дитионилпиррола наносился с помощью микропипетки на поверхность жидкой субфазы, представляющей собой раствор соли трехвалентного железа в бидистиллированной воде. Далее монослой выдерживался в течение 10 мин для испарения растворителя, после чего сжимался подвижным барьером до формирования монослоя Ленгмюра в кристаллическом состоянии с посадочной площадкой $66 \pm 1,45$ Å²/молекула.

Для получения монослоев из мУНТ, нековалентно функционализированных стеариновой кислотой или фосфолипидом, спиртовой раствор смешивали с раствором стеариновой кислоты или фосфолипида в гексане. Полученную смесь гомогенизировали до образования мицелл жирных кислот с мУНТ внутри [35]. Затем гомогенизат выкапывали на поверхность ЛБ-ванны. Монослой Ленгмюра–Блоджетт с комплексами олигонуклеотид/мУНТ формировали аналогичным образом.

Сжатие монослоя дитионилпиррола проводилось со скоростью 4 мм/мин. Скорость сжатия монослоя из мУНТ или смеси олигонуклеотида с мУНТ – 2,3 мм/мин. Коэффициент переноса принимает значения около 1,0 для первого монослоя. Все сформированные монослои выдерживали в течение 5 мин для перехода в равновесное состояние и переносили при постоянном поверхностном давлении 29,0 мН/м на поверхность подложки путем опускания и вынимания вертикально ориентированной пластинки сквозь монослой в субфазу (нанесение Y-типа). Подложки с нанесенной ЛБ-пленкой сушились при температуре 20 °С в течение 24 ч.

Визуализация и дифракция. Электронограммы и микродифракция исследуемых образцов получены на просвечивающем электронном микроскопе (ПЭМ) JEM-100CX (JEOL, Япония) ТЕМ при ускоряющем напряжении 100 кВ. Объекты электронно-микроскопических исследований предварительно наносились на медные сеточки с формваровым полимерным покрытием (поливинилформаль, приготовленный из 0,1–0,2 % раствора формвара в дихлорэтаноле).

Структурный и дифракционный анализ. Распределение мУНТ в ТЕ буфере после ультразвуковой обработки показано на рис. 1. Как видно из этого рисунка, за время ультразвуковой обработки (10 мин, 22 кГц) мУНТ равномерно распределяются по объему, и гибкие тонкие УНТ (диаметр d) геликоидально закручиваются с шагом спирали $\sim 1/d$.

Морфология ЛБ-монослоев с мУНТ, нековалентно функционализированными стеариновой кислотой, показана на рис. 2. Согласно ПЭМ-изображениям, диаметр используемых углеродных нанотрубок варьируется от 2,5 до 20 нм, длина – от 0,5 до 2,5 мкм. мУНТ имеют открытые концы (рис. 2, а).

Распределение ssДНК-олигонуклеотид (ON1)/мУНТ в ТЕ буфере после ультразвуковой обработки показано на рис. 3, 4. Комплексы ssДНК/мУНТ имеют структуру типа кабеля (рис. 3), сердцевинкой которого является проводящая мУНТ, а оболочкой («кожухом») – слой самоорганизованного олигонуклеотида темного цвета. Собственно изображение УНТ – ярко белое с резко очерченным темным краем. Темный цвет указывает на высокую плотность олигонуклеотида, самоорганизованного на поверхности УНТ. Стэкинговое взаимодействие уменьшает поляризацию УНТ в трансверсальном к поверхности УНТ направлении (спонтанную поляризацию), вследствие чего шаг спирали увеличивается (рис. 3, б). На самоорганизованном нуклеотидном «кожухе» происходит эпитаксиальный рост отросткообразных кристаллитов только олигонуклеотида (рис. 4). Блекло-белый цвет кристаллитов свидетельствует об их рыхлости и, соответственно, неплотной молекулярной упаковке.

После нековалентной функционализации молекулами стеариновой кислоты карбоксилированные углеродные нанотрубки формируют высокоупорядоченные и высокоориентированные ЛБ–УНТ-кластеры в процессе эпитаксиального роста

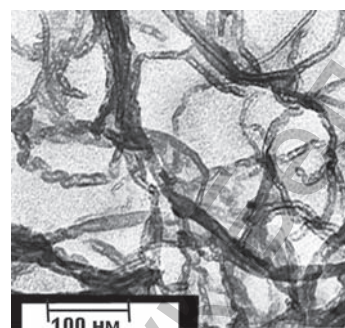


Рис. 1. ПЭМ-изображение мУНТ в ТЕ-буфере



Рис. 2. ПЭМ-изображения двух монослойных ЛБ-пленок смеси мУНТ–стеариновая кислота, сформированных на поверхности бидистиллированной воды (а) и на поверхности водного раствора соли $\text{Ce}_2(\text{SO}_4)_3$ (б) и 2 ЛБ-монослоев смеси ON1–мУНТ–стеариновая кислота (в)

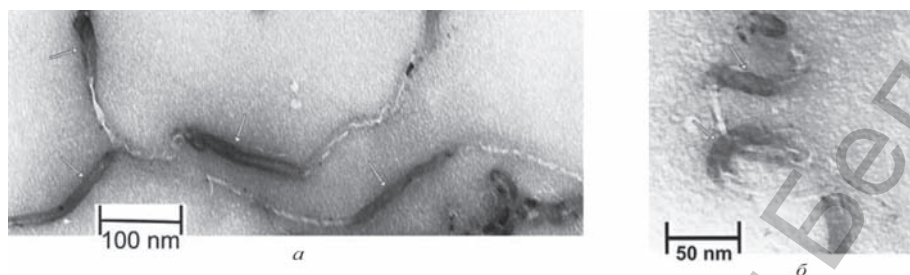


Рис. 3. ПЭМ-изображения комплексов ssДНК/мУНТ в ТЕ-буфере. Области электронно-плотного олигонуклеотида указаны стрелками

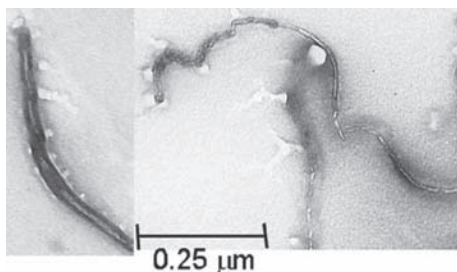


Рис. 4. ПЭМ-изображение отростков – кристаллитов свободного олигонуклеотида, эпитаксиально выросших на комплексах ssДНК/мУНТ в ТЕ-буфере

на кристаллических железосодержащих ЛБ-пленках олигомера пиррол-тиофенового ряда [35]. Параметры дифрактограмм ЛБ–УНТ-кластеров на ЛБ-пленках дитионилпиррола представлены в табл. 2. Кроме того, дифрактограммы ЛБ–УНТ-кластеров на поверхности сетки, модифицированной дитионилпирроловой ЛБ-пленкой, также характеризуются линиями Кикучи [35]. Электрограммы с линиями Кикучи получаются от совершенных монокристаллов с большим размером блоков ($5 \cdot 10^{-7}$ – 10^{-6} см) и малой разориентацией [47–49]. Поэтому

расположенные на ЛБ-пленках дитионилпиррола ЛБ-кластеры карбоксилированных и нековалентно функционализированных стеариновой кислотой мУНТ представляют собой монокристаллиты.

Таблица 2. Межплоскостные расстояния в высокоупорядоченном ЛБ-массиве УНТ

Фаза	d_p , нм	$2d_p$, нм
5 кристаллических Fe-содержащих монослоев HDTP	0,682	–
3-монослойная ЛБ-пленка фосфатидилхолина	0,384	–
Ламеллярный мультислой фосфатидилхолина [51]	0,411	–
Олигонуклеотидный кристаллит, формирующийся на поверхности УНТ в ЛБ-пленке	0,438	–
2 монослоя смеси мУНТ–стеариновая кислота, расположенные на Fe-содержащей ЛБ-пленке HDTP (ЛБ–УНТ-кластер)	0,236	0,512
мУНТ в ЛБ-пленке, сформированной сжатием смеси мУНТ–олигонуклеотид ON1 с фосфатидилхолином или стеариновой кислотой	–	0,614
Гексагональный графит* 2H (вюрцит)	0,255	0,6706
Гексагональный чаоит* (кратерный углерод)	0,224	0,563

Примечание: * – каталог ASTM.

На дитионилпирроловых ЛБ-пленках также формируются наиболее высокоупорядоченные ЛБ-монослои из смеси ON1–мУНТ–стеариновая кислота с параметрами, представленными в табл. 1. Дифракционная картина (лауэграмма) комплексов ssДНК/мУНТ имеет три рефлекса в нулевом узле обратной решетки. Класс симметрии такого типа лауэграмм – C_2 [47–50]. На рис. 2, в видно, что ЛБ-комплексы ON1/мУНТ представляют собой мУНТ, покрытые плотноупакованным слоем молекул олигонуклеотида, толщина l_{st} нуклеотидного слоя – от 2 до 10 нм. Расстояние между стенками УНТ при добавлении олигонуклеотидных слоев возрастает с 0,512 до 0,614 нм (см. табл. 2).

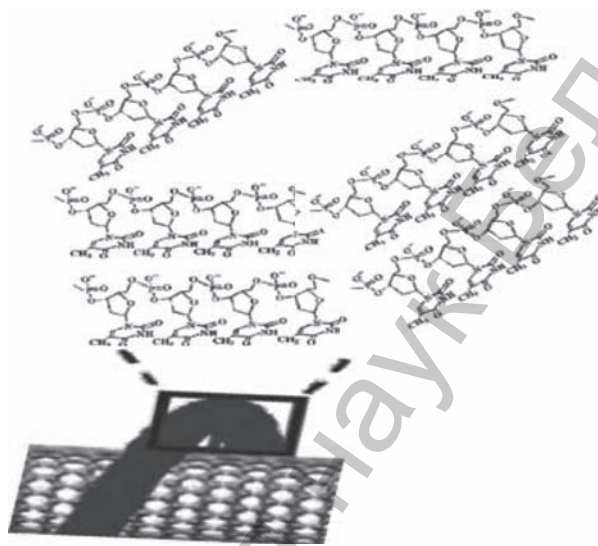


Рис. 5. Модель самоорганизованных комплексов однонитчатого олигонуклеотида с УНТ

В отличие от лауэграмм ЛБ-пленок смеси ON1–нековалентно функционализированные стеариновой кислотой мУНТ, рефлексы на лауэграммах ЛБ-пленок смеси ON1–нековалентно функционализированные фосфолипидом мУНТ расположены радиально. Это обусловлено неоднородностью покрытия из разнородных молекул фосфолипида, причем межплоскостное расстояние в ЛБ-монослое фосфолипида $\sim 0,384$ нм. ЛБ-комплексы мУНТ с олигонуклеотидом в монокристаллической форме характеризуются межплоскостным расстоянием 0,438 нм независимо от вида нековалентной функционализации.

На основании дифракто- и электронограмм структура ssДНК/мУНТ комплекса может быть представлена в виде рис. 5.

ПААГ-электрофоретический анализ. Эффект УНТ-зависимого тушения флуоресценции FAM-олигонуклеотида с использованием ПААГ-электрофореза. Для однонитевого олигонуклеотида вероятность интеркалирования молекул Zubr Green I между нуклеотидными основаниями пренебрежимо мала. Поэтому флуоресценция однонитевого олигонуклеотида в геле обусловлена только высвечиванием FAM, экстрадированным наружу.

Оценим присутствие несвязанного (свободного) FAM-олигонуклеотида в электрофоретических пробах смеси мУНТ и FAM-олигонуклеотида, предварительно озвученной ультразвуком в течение 1 мин. Как видно на рис. 6, молекулярная масса высвечиваемого вещества совпадает с молекулярной массой свободного FAM-олигонуклеотида. Высвечивание мУНТ (рис. 6, а, дорожка 10) и ком-

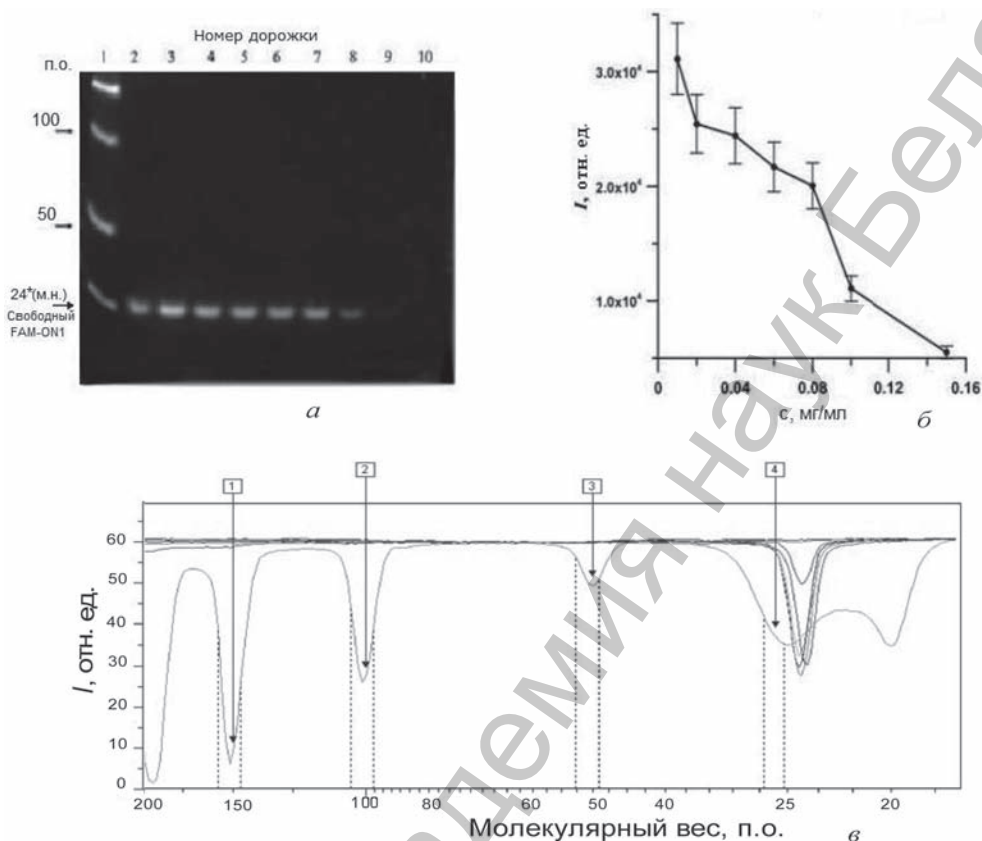


Рис. 6. *а* – Электрофореграмма комплексов мУНТ/FAM-ON1: дорожки 1 – ДНК-маркер, 2 – FAM-ON1, 3–9: комплекс мУНТ/ FAM-ON1 с концентрацией мУНТ $c_{\text{мУНТ}} = 0,01; 0,02; 0,04; 0,06; 0,08; 0,1; 0,15$ мг/мл соответственно; 10 – мУНТ ($c_{\text{мУНТ}} = 0,1$ мг/мл); *б* – Зависимость интенсивности флуоресценции FAM-меченного олигонуклеотида от концентрации мУНТ; *в* – Денситограмма электрофореза. ДНК-маркер 150, 100, 50, 25 пар оснований (п. о.) указан стрелками 1, 2, 3, 4 соответственно. Молекулярный вес FAM-ON1 порядка 24 дается в мононуклеотидах (м. н.)

плексов мУНТ/FAM-ON1 (рис. 6, *а*, дорожки 3–9) отсутствует. Согласно рис. 6, *б*, интенсивность флуоресценции FAM-олигонуклеотида в электрофоретических пробах (дорожках) снижается практически до нуля с возрастанием концентрации карбоксилированных мУНТ ($c_{\text{мУНТ}}$ с 0,01 до 0,15 мг/мл). Так как флуоресцирует свободный FAM, такое понижение содержания свободного FAM-ON1 в полиакриламидном геле происходит из-за π – π -стэкингового взаимодействия между цепью гетероциклических оснований олигонуклеотида и гексагонами поверхности углеродной нанотрубки [28; 52].

Нами также установлен эффект тушения флуоресценции FAM в гидратированных олигонуклеотидных ассоциатах. Концентрация свободного FAM-ON1 в электрофоретических пробах с мУНТ уменьшается за счет комплексообразования. С уменьшением концентрации свободного FAM-ON1 вероятность образова-

ния олигонуклеотидных ассоциатов падает, а вероятность выталкивания FAM-флуорофора из нуклеотидного окружения возрастает. Соответственно, число экстрадированных наружу, непотушенных флуоресцентных FAM-меток возрастает. Число нуклеотидных ассоциатов, в которых флуоресценция FAM гасится связанной водой, становится больше в отсутствие мУНТ. Поэтому (как видно из сравнения электрофоретических проб 2 и 3 на рис. 6) можно подобрать такую концентрацию мУНТ, при которой свечение FAM больше, чем в отсутствие мУНТ.

Так как, согласно структурным исследованиям, термодинамически выгодно образование оболочки кристаллического олигонуклеотида толщиной l_{st} вокруг мУНТ, а гель-электрофорезом установлен концентрационный тип тушения флуоресценции чистого FAM-ON1, то вышеописанное мУНТ-зависимое тушение флуоресценции FAM-ON1/мУНТ обусловлено плотной упаковкой олигонуклеотида на поверхности мУНТ за счет стэкингового притяжения углеродной нанотрубкой олигонуклеотидных оснований.

Температурные эффекты при комплексообразовании мУНТ/олигонуклеотид. Влияние температуры на комплексообразование оценивалось в предположении обратно пропорциональной зависимости ионной проводимости раствора от температуры T по аналогии с электропроводностью σ твердых тел [53]:

$$\sigma = q^2 Nk / (DT), \tag{1}$$

где q – электрический заряд иона; k – скорость реакции иона с противоионом; D – коэффициент диффузии; N – ионная плотность. Используя (1), относительная температура $T_{m,отн}$ электрофореза рассчитывалась по формуле

$$T_{m,отн} = \frac{T_m}{T_1} \sim \frac{W_m I_1^2}{W_1 I_m^2},$$

где T_m , I_m , W_m , $m = 1, 2, 3$ – температура, электрический ток и мощность m -го электрофореза соответственно. Три электрофореза, параметры которых приведены в табл. 3, представлены кривыми с символами «●», «■» и «◆» на рис. 7 для относительных температур $\{T_{m,отн}\} = \{0,59; 1; 1,26\}$ соответственно. Как видно из рис. 7, до концентраций $c_{mУНТ} \sim 0,08$ мг/мл включительно, увеличение T приводит к возрастанию интенсивности I свечения и, соответственно, числа свободных молекул FAM-ON1. Это обусловлено уменьшением вероятности π - π -связывания отдельного олигонуклеотида с мУНТ с увеличением T из-за роста интенсивности флуктуаций.

Т а б л и ц а 3. Параметры электрофореза в зависимости от относительной температуры при напряжении 100 В

I_n , мА	W_n , Вт	T_n/T_1
19,1	2	1
30,5	3	0,59
17,0	2	1,26

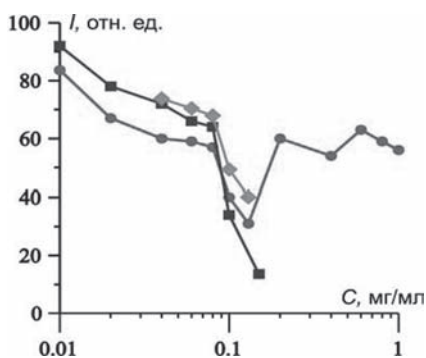


Рис. 7. Зависимости интенсивности I свечения FAM-ON1 от концентрации c МУНТ. Линиями с символами « \blacklozenge », « \blacksquare » и « \blacklozenge » обозначены зависимости для относительных температур 0,59; 1 и 1,26 соответственно

При высоких концентрациях $c_{\text{МУНТ}} \sim 0,1$ и 0,15 мг/мл, когда молекулы FAM-ON1 начинают взаимодействовать между собой, понижение относительной температуры от 1 до 0,59, наоборот, приводит к возрастанию I , поскольку малая диффузионная подвижность FAM-ON1 препятствует быстрой релаксации комплекса МУНТ/ON1 к равновесному состоянию с минимумом свободной энергии посредством минимизации межчастичного ориентационного взаимодействия в олигонуклеотидном покрытии, вследствие чего часть молекул FAM-ON1 не успевают связаться с МУНТ. Вместе с тем очень большие температуры также нежелательны при высоких $c_{\text{МУНТ}}$, поскольку они нарушают равновесное состояние с минимумом свободной энергии.

Ослабление эффекта УНТ-зависимого тушения свечения FAM-олигонуклеотида в ПААГ-электрофоретических пробах при высоких концентрациях МУНТ. При концентрации $c_{\text{МУНТ}} \sim 0,15$ мг/мл и при фиксированном значении концентрации c_{FAM} (FAM-ON1) среднее число свободных молекул олигонуклеотида, не связанных с углеродными нанотрубками, уменьшается практически до нуля с образованием комплекса МУНТ/ON1 (см. кривую с символами « \blacksquare » на рис. 7). Однако, согласно рис. 7 (кривая с символами « \blacklozenge »), эффективное тушение FAM-флуоресценции в смеси МУНТ с ON1 имеет место не при всех концентрациях олигонуклеотида ($c_{\text{МУНТ}} \geq 0,15$ мг/мл), а только при некоторых оптимальных толщинах олигонуклеотидного покрытия $l_{st(1)}, l_{st(2)}, l_{st(3)}$ углеродной трубки, соответствующих $c_{\text{МУНТ}} \approx 0,15; 0,4; 0,9$ мг/мл. Это свидетельствует о существовании дискретного набора размеров комплекса МУНТ/ON1 с термодинамически устойчивой структурой.

Нестабильность олигонуклеотидного покрытия, формируемого на МУНТ и имеющего толщину $l_{nst(i)}$ между устойчивыми значениями $l_{st(i)}$ и $l_{st(i+1)}$, является причиной ослабления тушения FAM-флуоресценции посредством МУНТ. Например, содержание свободного FAM-ON1 в полиакриламидном геле не понижается для концентрации МУНТ 0,2 мг/мл, а, наоборот, возрастает относительно концентрации МУНТ 0,15 мг/мл (см. кривую с символами « \blacklozenge » на рис. 7). Дальнейшее повышение концентрации МУНТ и, соответственно, увеличение толщины ON1-покрытия приводит к такому размеру МУНТ/ON1-комплекса, что он снова приобретает стабильность.

Итак, существует критическая толщина олигонуклеотидного покрытия $l_{st(i)} < l_{c(i)} < l_{nst(i)}$, при которой структура наноконструкта МУНТ/ON1 становится термодинамически неустойчивой и распадается. Структура МУНТ/ON1 оказывается

неустойчивой при концентрациях $c_{\text{МУНТ}} \approx 0,2; 0,6$ мг/мл (погрешность определена размерами символов). Такая немонотонная зависимость интенсивности FAM-свечения от концентрации возможна, если олигонуклеотид самоорганизуется в виде подслоя конечной толщины (подболочки) посредством кооперативного взаимодействия. Так как концентрация $c_{\text{МУНТ}} \sim 0,9$ мг/мл, при которой еще наблюдается МУНТ-зависимое тушение, в шесть раз больше первой тушащей концентрации $\sim 0,15$ мг/мл, то максимально наблюдаемое электрофоретическое число (n_{max}) олигонуклеотидных подболочек порядка 6. При этом олигонуклеотидные подболочки (подслои) нарастают на поверхности нанотрубки последовательно друг за другом с образованием электронно-плотной «шубы» (рис. 3, 4).

Ультразвуковое воздействие. При высоких концентрациях $c_{\text{МУНТ}}$ (например, 1,0 мг/мл) и времени УЗ-обработки не более 5 мин эффективность тушения флуоресценции уменьшается относительно низких $c_{\text{МУНТ}}$, поскольку интенсивность свечения свободного FAM-ON1 возрастает (рис. 8). При высоких дозах ультразвуковой радиации комплексообразование МУНТ с олигонуклеотидом не только усиливается, но и частично ослабевает в результате «отшелушивания» верхних монослоев олигонуклеотида. Это происходит при временах УЗ-обработки более 5 мин для концентраций МУНТ 0,1 мг/мл, в связи с чем интенсивность FAM-флуоресценции возрастает, как показывает кривая 1 на рис. 8. При высоких концентрациях МУНТ 1,0 мг/мл верхние монослои плотного кристаллического олигонуклеотида, слабо взаимодействующие с МУНТ, отрываются от основной массы под действием ультразвука до тех пор, пока толщина олигонуклеотидного покрытия не станет равной квазиустойчивой толщине олигонуклеотидного слоя l_{qust} . «Отшелушившийся» олигонуклеотид пополняет фракцию свободного FAM-ON1. Если этого количества достаточно для формирования квазиустойчивого нуклеотидного покрытия с $l_{\text{qust}} > l_c$, то происходит связывание FAM-ON1 с той частью МУНТ, которая не имеет покрытия. Так как доля комплексов МУНТ/олигонуклеотид в пробе возрастает, то количество свободных FAM-ON1 уменьшается. Соответственно, свечение FAM-зонда для $c_{\text{МУНТ}} 1$ мг/мл ослабевает при временах УЗ-обработки 10 мин, а не при 5 мин обработки как для $c_{\text{МУНТ}} 0,1$ мг/мл (кривая 2, рис. 8).

Таким образом, комплекс МУНТ/олигонуклеотид представляет собой МУНТ, покрытую монокристаллическим слоем электронно-плотного олигонуклеотида в процессе самоорганизации. Эффект тушения флуоресценции при высоких концентрациях МУНТ может ослабевать, что обусловлено как возрастанием расстояния от олигонуклеотида до поверхности МУНТ, так и кооперативным характером комплексообразования, когда дальнейшее присоединение молекул FAM-ON1 к МУНТ становится энергетически невыгодно из-за ослабления π - π взаимодействия. В электрофоретической пробе кроме олигонуклеотида, самоорганизованного на поверхности МУНТ, также присутствует свободный, несвязанный с МУНТ, олигонуклеотид.

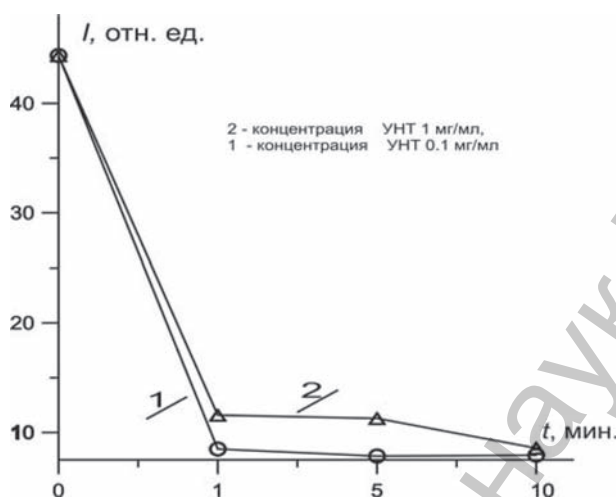


Рис. 8. Зависимость интенсивности свечения смеси олигонуклеотида FAM-ON1 с мУНТ от времени ультразвуковой обработки

Рамановская спектроскопия комплексов dsДНК/мУНТ: поверхностно-усиленное комбинационное рассеяние в мУНТ на поверхности Si. Покажем, что плотная упаковка колец FAM-олигонуклеотида в кристаллической плоскости, параллельной поверхности мУНТ, обеспечивает перенос возбуждения с электронных орбиталей FAM-зонда на энергетические уровни мУНТ с последующей безызлучательной релаксацией.

Добавление плацентарной dsДНК с или без мУНТ в гексановый или спиртовой раствор стеариновой кислоты с последующей ультразвуковой обработкой дает мицеллярную форму dsДНК или комплексов dsДНК/мУНТ соответственно. Рамановский спектр мицелл с ДНК, выкапываемых на полированную кремниевую подложку, имеет все характеристические линии комбинационного рассеяния света в dsДНК [54] (рис. 9).

Слабоинтенсивные рамановские спектры высушенных мУНТ до нековалентной функционализации представлены на рис. 10, а. Рамановские спектры графена и графеноподобных материалов хорошо изучены [55]. Спектральные полосы D и D' на рис. 10 проявляют наличие дефектов в графеновой решетке и соответствуют оптическим поперечным и продольным колебаниям в плоскости вблизи точки K зоны Бриллюэна. Эти фононы являются колебаниями ядер в поле (терме) $\pi(p_z)$ -электронов валентной зоны или $\pi^*(d)$ -электронов зоны проводимости. Пик D'' — продольная акустическая мода вблизи точки K . Спектральная полоса G также происходит от колебаний атомов углерода в плоскости, но в электронно-колебательном терме sp^2 -гибридизированных электронов. Этот резонанс соответствует оптическим плоскостным фононам в окрестности точки Γ зоны Бриллюэна. D^3 и D^4 — поперечная и продольная акустические ветви плоскостных колебаний в окрестности точки Γ . $2D$ — пик двухфононного поглощения (удвоенная D -мода).

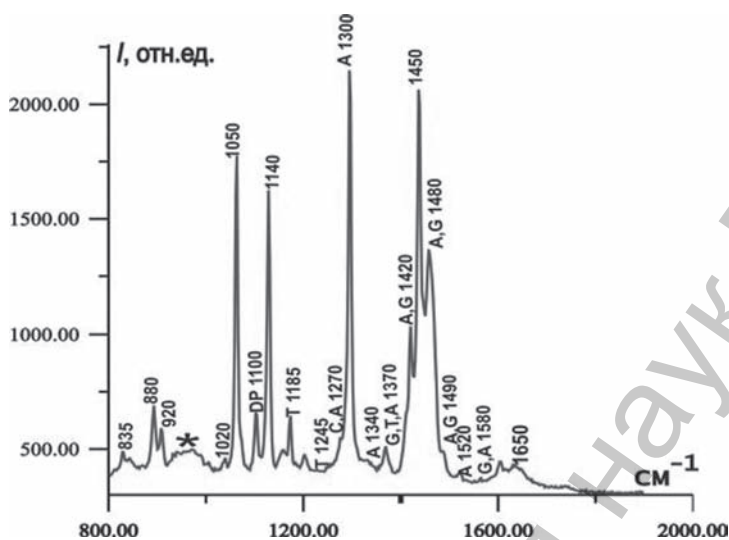


Рис. 9. Рамановский спектр мицелл, сформированных в гексановом растворе смеси стеариновой кислоты и плацентарной ДНК, на Si; лазерная мощность 20 мВт на длине волны 532 нм. Аденин, гуанин, тимин и цитозин обозначены через A, G, T и C соответственно. DP – фосфодиэфирная связь. «*» – лазерный плазмонный пик. Цифрами указаны характеристические частоты колебаний атомных групп в ДНК

Так называемая «дышащая» мода мУНТ наблюдается на рис. 10, *a* в частотном диапазоне от 60 до 430 cm^{-1} .

Рамановские спектры dsДНК/мУНТ-комплексов в гидрофобных мицеллах представлены на рис. 10, *б*. Сравнение рис. 10, *a* и 10, *б* показывает, что комплексообразование значительно усиливает интенсивность УНТ-мод: D , G , $D'' + D$, $2D$, $D' + D$. Так как характеристические моды dsДНК в спектре на рис. 10, *б* не наблюдаются, и следовательно, имеет место тушение свечения dsДНК, то это усиление УНТ-колебаний обусловлено переносом носителей электрического заряда и энергии квазичастичных возбуждений с нуклеотидных оснований на атомы мУНТ. Вероятность перехода электронов с валентных $\pi(p_z)$ -орбиталей нуклеотида на $\pi^*(d)$ -орбитали мУНТ так высока, что свечение молекул ДНК полностью тушится. На рис. 11, *a* представлен рамановский спектр монослоя гидрофильных мицелл с dsДНК/мУНТ-комплексами, находящимися на Si-подложке. Согласно рис. 11, *a*, тушение свечения ДНК в монослое происходит не только за счет безызлучательного переноса на мУНТ с последующим усилением D -, G -, и $2D$ -УНТ-мод, но и за счет возбуждения поверхностных и плазмонных колебаний Si-подложки.

мУНТ являются графеноподобным материалом. мУНТ, как и графен, обладают высокой электропроводностью [56]. Носителями электрического заряда в графене являются отрицательно и положительно заряженные квазичастичные возбуждения. Это – положительно и отрицательно заряженные трехчастичные экситоны [57].

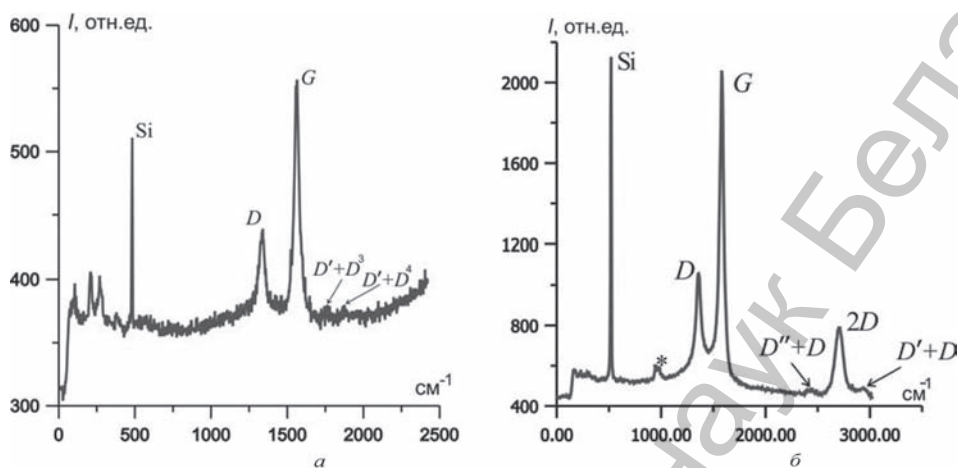


Рис. 10. Рамановские спектры высушенных карбоксилированных мУНТ, мощность накачки 20 мВт на длине волны лазера 532 нм (а); и гидрофобных мицелл стеариновой кислоты с комплексами мУНТ/ДНК, мощность накачки 5,76 мВт на длине волны лазера 473 нм (б). Символы «Si» и «*» обозначают колебательную моду кремния и лазерный плазмонный пик соответственно

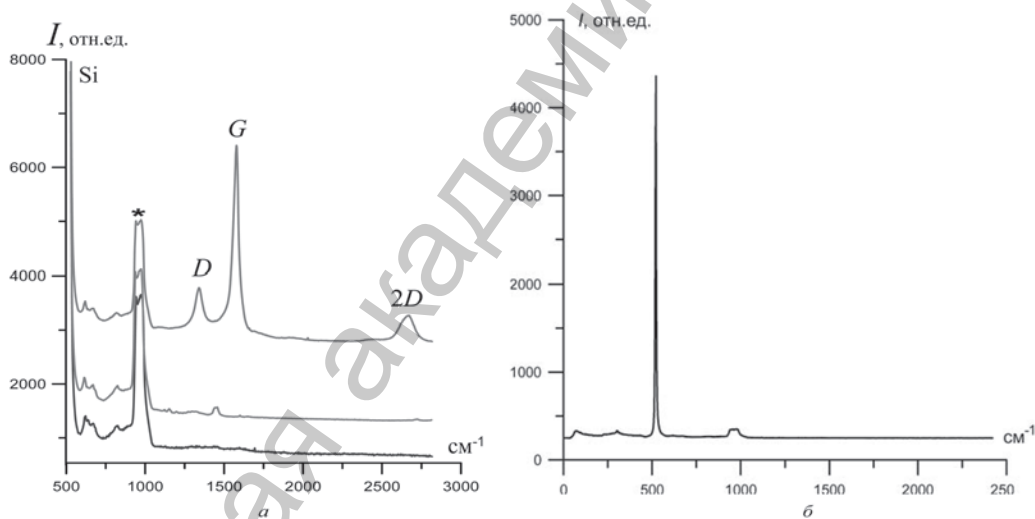


Рис. 11. Рамановские спектры монослоя комплексов мУНТ/ДНК на поверхности кремния при мощности накачки 3,0, 5,76 и 20 мВт для нижней, промежуточной и верхней кривых соответственно (а). Комбинационное рассеяние света кремниевой подложкой, мощность накачки 20 мВт (б). Возбуждение лазером на длине волны 532 нм. Символы «Si» и «*» обозначают колебательную моду кремния (520 cm^{-1}) и лазерный пик плазмонного рассеяния в кремнии соответственно

Носители заряда в беспримесном графене локализируются в отдельных областях валентной зоны (в так называемых лужах) конуса [56] и не попадают в K -точку – вершину дираковского конуса.

Модель локализации электронов углеродной нанотрубки в слабом электрическом поле была построена в [58]. Согласно этой модели, в слабоинтенсивных

электрических полях электроны, например, проводящих одностенных УНТ типа «зигзаг» могут локализоваться внутри трубки, и соответственно, трубки имеют дырочную проводимость. Однако в интенсивных электрических полях локализованные носители заряда также начинают принимать участие в транспорте заряда.

Хотя беспримесный графен и имеет свободные носители заряда, в силу bipolarности его уровень Ферми находится в точке K , где носители заряда отсутствуют. Добавочная электронная плотность, переносимая с ароматических соединений, обеспечит смещение уровня Ферми в зону проводимости.

При низких интенсивностях накачки количество заряда, перенесенного с ДНК на мУНТ, незначительно. Вследствие этого вся добавочная электронная плотность аннигилирует, а высвободившаяся энергия затрачивается на переход графеновых носителей заряда (отрицательно заряженных экситонов) из валентной зоны в зону проводимости. Так как в широком экситонном спектре мУНТ имеются частоты, совпадающие с частотами плазменных колебаний, то плазмоны Si параметрически резонируют на этих частотах с раскачиванием электронной подсистемы Si (возрастание интенсивности рамановского спектра линий Si), как это следует из сравнения нижней кривой на рис. 11, *a* и графика на рис. 11, *б*.

С ростом интенсивности лазерного возбуждения из-за малого числа локализованных носителей заряда в чистом графене не вся добавочная электронная плотность, переносимая с ароматических соединений, аннигилирует, и поэтому часть ее становится примесью. Так как добавочные электроны, находящиеся на π^* -орбиталях мУНТ, являются локализованными d -электронами, то можно рассматривать эту примесь как пузырьки с локализованными d -электронами. Состояния пузырьков стабилизируются переходом дырок отрицательных экситонов и распадом последних. Получившийся пузырек электронной плотности с дыркой внутри подобен атому. Многофотонное поглощение за счет отражательной дифракции на границе пузырька электронной плотности с дыркой приведет к эффекту Ханле – смешиванию d -орбитали с s -подобными орбиталями из оболочки со следующим значением главного квантового числа n . Это смешанное состояние описывается волновой функцией

$$|\Psi\rangle = |d\rangle + f(H_{ext})|s\rangle. \quad (2)$$

Рассмотрим переход с p -орбиталей на уровни состояния (2) с полным моментом импульса $J = j_d + j_s = L + S = 1$ при значении неравновесного спина $S = 0$ и углового момента $L = 1$. Эффект Ханле приводит к расщеплению p -орбиталей. Переход из состояния с моментом импульса $J = 2(l - s) = 1$ с $l = 1$ и $s = 1/2$ запрещен. Этот запрещенный переход проявляется в рамановском спектре на рис. 11, *a*, промежуточная кривая как небольшой пик на частоте $\sim 1410 \text{ см}^{-1}$, наряду с УНТ-усиленной интенсивностью спектра комбинационного рассеяния Si.

При больших интенсивностях лазерной накачки наблюдается осцилляторный эффект Ханле, приводящий к вырождению p -орбиталей в состояние с неравновесным спином $S = 0$ и орбитальным моментом $L = 1$. В этом случае атомоподоб-

ные пузырьки d -электронов с дырками в их электронной плотности в качестве донорных примесей могут также добавить недостающую электронную плотность в окрестности точки K графена посредством резонансного возбуждения когерентных отрицательно заряженных экситонов X^- («дифракционных экситонов») [53]. Поскольку переходы p -электронов с вырожденных орбиталей $S = 0, L = 0$ в смешанное состояние $S = 0, L = 1$ разрешены, то возбужденные p -электроны могут гибридизировать с $\pi^*(d)$ -орбиталями мУНТ. Появившаяся гибридизационная щель приведет к переходу электронов на $\pi(p_z)$ -орбитали с испусканием фотонов, энергия которых затрачивается на переход графеновых носителей заряда (отрицательно заряженных экситонов) из валентной зоны в зону проводимости. В результате, точно также как при низких интенсивностях, параметрический резонанс колебательных и плазмонных частот Si на собственных частотах свободных носителей заряда приведет к мУНТ-усиленному резонансному рамановскому спектру Si на рис. 11, *a*, верхняя кривая.

Дефекты в виде донорных примесных уровней пузырьков с d -электронами проявляются в процессе гибридизации орбиталей смешанного состояния $S = 0, L = 1$ с $\pi^*(d)$ -орбиталями мУНТ в зоне проводимости (точке K зоны Бриллюэна) через их рассеяние на колебательных D - и $2D$ -модах графеноподобной зонной структуры углеродных нанотрубок на рис. 11, *a*, верхняя кривая. Кроме того, квазичастичные возбуждения X^- резонируют с s -электронами углерода C , участвующими в sp^2 -гибридизации, и соответственно, экситонная энергия рассеивается в рамановскую полосу G , как видно на рис. 11, *a*, верхняя кривая.

В отличие от $2D$ -упаковки dsДНК/мУНТ-комплексов в монослое, в гидрофобных мицеллах стеариновой кислоты с dsДНК/мУНТ-комплексами, рамановский спектр которых приведен на рис. 10, *б*, имеет место трехмерная упаковка. Рассчитаем радиус экситона X^- по формуле $r_{X^-} = \frac{1}{2}\sqrt{\pi ad}$ [59]. Здесь d – толщина проводящей части образца – в нашем случае диаметр мУНТ; a – радиус экситона в объемном образце. Для монослоя смеси dsДНК с мУНТ значение a равно размеру dsДНК/мУНТ-комплекса: от 10 до 20 нм, для гидрофобных мицелл выберем в качестве a их размер 1 мкм. Тогда рассчитанный радиус экситона X^- в этих мицеллах оказывается в 10 раз больше, чем в монослое. Поэтому слабая связь в электрон-дырочных парах обуславливает их локализацию на дефектах. Как видно из сравнения рис. 10, *б* с рис. 11, *a*, в связи с понижением числа свободных носителей заряда число толчков в параметрическом резонансе понижается и, соответственно, на рис. 10, *б* интенсивность лазерного плазмонного пика и комбинационного рассеяния Si снижается, как и интенсивность X^- -усиленных рамановских спектральных полос графена: $D, G, 2D$. Локализованные экситоны распадаются в $D + D'$ - и $D + D''$ -моды на рис. 10, *б*.

Плотное прилегание ароматических колец ФАМ к мУНТ также, как и плотная упаковка нуклеотидных гетероциклов, обеспечивает дальний зарядовый перенос с возникновением транспорта свободных экситонных носителей заряда. Таким

образом, в комплексах мУНТ/FAM–олигонуклеотид имеет место экситонный механизм наноразмерного тушения FAM-флуоресценции.

Электрофоретическое детектирование гибридизации на комплексах углеродных нанотрубок с олигонуклеотидом. ПААГ-электрофорез и рамановская спектроскопия показали, что связывание мУНТ с FAM-меченным олигонуклеотидом позволяет углеродным нанотрубкам функционировать в качестве эффективных нанотушителей флуорофора FAM. Данный эффект может быть использован при разработке нового подхода к выявлению SNP на основе тушения флуоресценции при комплексообразовании FAM-олигонуклеотида с мУНТ с последующим восстановлением флуоресценции в результате гибридизации FAM-олигонуклеотида с целевой ss-ДНК-последовательностью в растворе [20]. Далее проведем гетеродуплексный анализ (ГА). Из-за возникновения структурных нарушений в месте негомولوجичного спаривания нормальных и содержащих нуклеотидные замены фрагментов ДНК или олигонуклеотидов гетеродуплексы имеют иную электрофоретическую подвижность по сравнению с гомодуплексами за счет конформационных особенностей в местах некомплементарных нуклеотидов – мисматчей [3; 4; 6].

Для определения возможности использования молекулярных бакенов на основе мУНТ с целью генотипирования ОНП, гибридизация свободного FAM-меченного олигонуклеотида FAM-ON1 и комплекса мУНТ/FAM-ON1 с целевыми олигонуклеотидными последовательностями (ДНК-мишень, табл. 1) различной степени комплементарности осуществлялась в растворе. Эффективность гибридизации оценивали по увеличивающейся интенсивности флуоресценции репортёрной группы за счет исчезновения эффекта тушения, вызванного диссоциацией комплекса мУНТ/FAM–олигонуклеотид и формирования в растворе гибридизационных нуклеотидных дуплексов [29] по завершении электрофореза.

Для оптимизации условий гибридизации были протестированы такие параметры, как время гибридизации и соотношения концентраций FAM-ON1 и комплементарного целевого олигонуклеотида ON2 в гибридизационном буфере; это соотношение в реакционной смеси варьировало в пределах 1 : 1, 1 : 3 и 1 : 6. При формировании гомодуплекса в результате гибридизации FAM-олигонуклеотида с комплементарным целевым олигонуклеотидом ON2 резко возрастает интенсивность флуоресценции FAM-флуорофора (рис. 12, а, дорожки 2–10). Данный эффект объясняется ослаблением взаимодействия FAM-флуорофора с нуклеотидными основаниями, образовавшими гомодуплекс [5].

Согласно рис. 12, б, интенсивность FAM-свечения для гетеродуплекса с тремя некомплементарными парами больше, чем в случае одной некомплементарной пары. Интенсивность свечения ON1/ON5 сравнима с интенсивностью свечения для случая полностью некомплементарного ON4. Наибольшей электрофоретической подвижностью обладает ON1/ON4. Интенсивность свечения гомодуплекса близка к интенсивности свечения гетеродуплекса с тремя некомплементарными парами. Поэтому использование флуоресцентной метки при проведении ПААГ-электрофореза недостаточно, чтобы осуществить SNP-генотипирование.

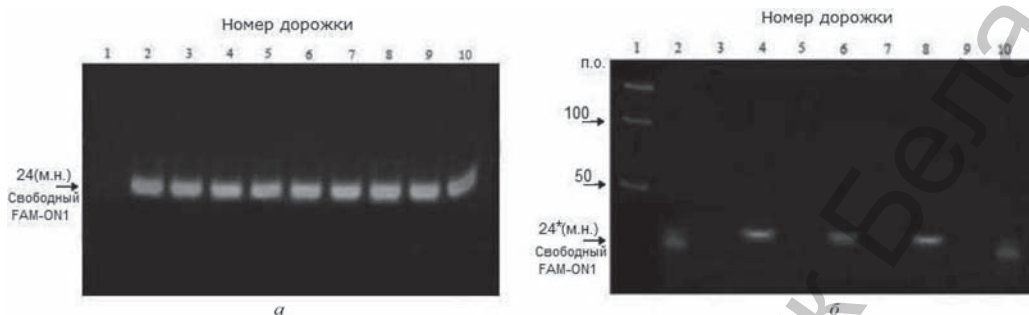


Рис. 12. Изменение интенсивности флуоресценции и электрофоретической подвижности дуплексов олигонуклеотид/олигонуклеотид, образовавшихся при гибридизации в растворе: *а* – зависимость от условий гибридизации (соотношение FAM-ON1 к ON2 в гибридизационной смеси и время гибридизации t). Дорожки: 1 – FAM-ON1 (контроль); с 2 по 10 – гомодуплекс FAM-ON1/ON2 при соотношениях FAM-ON1 к ON2, равных 1 : 1, 1 : 3, 1 : 6 соответственно; $t = 15$ мин для дорожек 2–4; $t = 30$ мин для дорожек 5–7; $t = 60$ мин для дорожек 8–10; *б* – зависимость от природы дуплекса. Дорожки: 1 – ДНК-маркер; 2 – FAM-ON1 (контроль); 3 – комплементарный олигонуклеотид ON2 (контроль); 4 – гомодуплекс FAM-ON1/ON2; 5 – олигонуклеотид с одним SNP (ON5) (контроль); 6 – гетеродуплекс FAM-ON1/ON5; 7 – нуклеотид с тремя SNP (ON3) (контроль); 8 – гетеродуплекс FAM-ON1/ON3; 9 – некомплементарный олигонуклеотид (ON4) (контроль); 10 – гетеродуплекс FAM-ON1/ON4

Максимальная интенсивность флуоресценции соответствовала гомодуплексу, полученному в результате гибридизации, продолжавшейся в течение 60 мин (рис. 12, *а*, дорожки 8–10). Интенсивность флуоресценции, соответствующей гомодуплексу, полученному при трех- и шестикратном увеличении концентрации комплементарного целевого олигонуклеотида в растворе (для каждого временного интервала) свидетельствует о том, что повышение концентрации не оказало заметного влияния на результаты гибридизации (рис. 12, *а*, дорожки 5–7 и 8–10). Поэтому проведение гибридизации FAM-олигонуклеотида с комплементарным целевым олигонуклеотидом в растворе оптимально при следующих условиях: эквимольное соотношение FAM-ON1/ON2; время гибридизации – 60 мин.

На основании вышеприведенных результатов, полученных с помощью метода гетеродуплексного анализа, исследована гибридизация целевых олигонуклеотидов различной степени комплементарности с входящим в комплекс МУНТ/FAM-олигонуклеотид FAM-олигонуклеотидом в растворе.

Как следует из анализа электрофореграммы, приведенной на рис. 13, *а*, присутствие в растворе комплементарного олигонуклеотида ON2 сопровождалось полным восстановлением флуоресценции FAM-олигонуклеотида, входившего в состав комплекса МУНТ/FAM-олигонуклеотид. Интенсивность восстановленной флуоресценции и электрофоретическая подвижность гомодуплекса полностью совпадали с аналогичными параметрами гомодуплекса, образовавшегося в результате гибридизации в растворе между свободным FAM-ON1 и комплементарным ему олигонуклеотидом ON2 (рис. 13, *а*, дорожки 5 и 6). Кроме того,

о формировании гибридационного гомодуплекса можно судить по положению полосы, соответствующей данному дуплексу, относительно маркера молекулярной массы и свободного FAM-ON1 (рис. 13, а, дорожка б).

Восстановление флуоресценции репортерной группы обусловлено диссоциацией комплекса мУНТ/FAM-олигонуклеотид и формированием гибридационного гомодуплекса в присутствии целевого комплементарного олигонуклеотида в растворе [52]. В случае же присутствия в растворе целевого олигонуклеотида ON4, некомплементарного FAM-ON1, наблюдалось только незначительное восстановление интенсивности флуоресценции, которая по интенсивности соответствовала флуоресценции свободного FAM-ON1 вне зависимости от того, входил ли FAM-олигонуклеотид до гибридазации в состав комплекса или находился в свободном состоянии (рис. 13, а, дорожки 8 и 9). Наблюдаемое сравнительное уменьшение интенсивности флуоресценции для дуплексов, содержащих один мисматч, было примерно в три раза ниже, чем для полностью комплементарных дуплексов (рис. 13, б, дорожки 5, 6 и 8, 9). Более того, электрофоретическая подвижность гетеродуплексов с одним мисматчем была меньше, чем у гомодуплексов (рис. 13, б, дорожки 6 и 9). В отличие от рис. 12, б, в присутствии мУНТ имеет место уменьшение электрофоретической подвижности гетеродуплекса, содержащего один мисматч, по сравнению с гомодуплексом. Таким образом, оказывается, что ГА на основе явления диссоциации комплексов мУНТ/FAM-олигонуклеотид, как высокочувствительных «нанобакенов», зависит от параметров мУНТ. Так как параметры последних не проявляются электрофоретически, то неполная диссоциация мУНТ/FAM-олигонуклеотид в процессе гибридазации делает электрофоретический ГА неоднозначным.

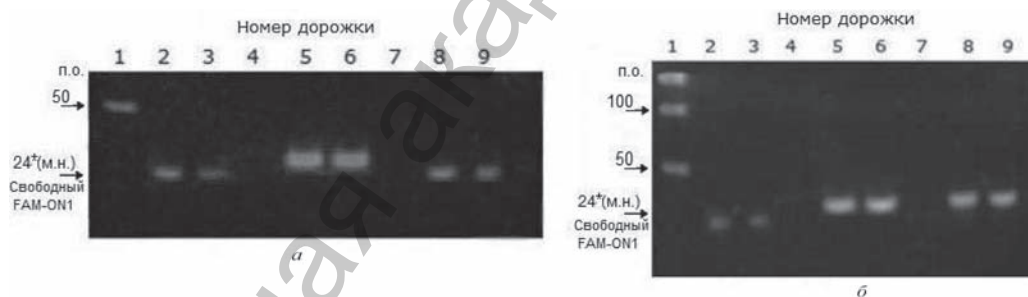


Рис. 13. Флуоресценция FAM-меченного олигонуклеотида при образовании дуплексов после диссоциации комплекса мУНТ/FAM-ON1 ($c_{\text{мУНТ}} = 0,04$ мг/мл): а – гибридазация с комплементарным и некомплементарным олигонуклеотидами. Дорожки: 1 – ДНК-маркер; 2 – FAM-ON1; 3 – комплекс мУНТ/FAM-ON1; 4 – комплементарный олигонуклеотид ON2; 5 – гомодуплекс FAM-ON1/ON2 без мУНТ; 6 – гомодуплекс FAM-ON1/ON2 с FAM-ON1/мУНТ; 7 – некомплементарный олигонуклеотид (ON4); 8 – гетеродуплекс FAM-ON1/ON4 без мУНТ; 9 – гетеродуплекс FAM-ON1/ON4 с FAM-ON1/мУНТ; б – гибридазация с олигонуклеотидом, содержащим одиночный SNP. Дорожки: 1 – ДНК-маркер; 2 – FAM-ON1; 3 – комплекс мУНТ/FAM-ON1; 4 – комплементарный олигонуклеотид ON2; 5 – гомодуплекс FAM-ON1/ON2 без мУНТ; 6 – гомодуплекс FAM-ON1/ON2 с FAM-ON1/мУНТ; 7 – олигонуклеотид с SNP (ON5); 8 – гетеродуплекс FAM-ON1/ON5 без мУНТ; 9 – гетеродуплекс ON1/ON5 с FAM-ON1/мУНТ

Электрохимическая импедансная спектроскопия ДНК-дуплексов. Приведем результаты электрохимического анализа степени связывания различных типов dsДНК с мУНТ.

В бидистиллированной воде диэлектрические свойства ЛБ-пленок мУНТ и комплексов олигонуклеотид/мУНТ проявляются в виде изменения электрической емкости двойного заряженного слоя Гельмгольца, формируемого на границе раздела фаз: изоляторный барьерный слой анодного оксида алюминия–вода. Для электрохимического детектирования использовались две области частот: низкочастотная (~100 кГц) и высокочастотная (~400–800 кГц). В низкочастотной области основной вклад в поляризацию пленки дает максвелл-вагнеровская поляризация проводящих включений. Вектор дипольной поляризации молекул или молекулярных групп релаксирует в высокочастотной области.

ЛБ–УНТ-кластеры эффективно экранируют электроды вследствие баллистического транспорта заряда в мУНТ. Поэтому процесс ионизации молекул воды в электрическом поле электродов подавляется и, соответственно, электрическая емкость $C_{\text{мУНТ}}$ датчика с ЛБ–УНТ-кластерами становится меньше, чем емкость чистого датчика. В высокочастотной области уменьшение $C_{\text{мУНТ}}$ составляет ~ -1 ÷ -1,5 пФ и практически не зависит от частоты.

Диэлектрическая проницаемость олигонуклеотидной оболочки в ЛБ–ssДНК/мУНТ-комплексах высокая, а степень экранирования значительно снижена из-за большого шага спирали и, как следствие, зарядового транспорта, в основном, поперек спирали, и соответственно, имеет место возрастание емкости датчика $C_{\text{ssДНК/УНТ}}$ на $\Delta C_{\text{ssДНК/УНТ}} > 0$. В высокочастотной области $\Delta C_{\text{ssДНК/УНТ}}$ практически не зависит от частоты и принимает значения от +2 до +6 пФ, определяемые массой компактифицированного олигонуклеотида ON1.

Датчики с ЛБ–ssДНК/мУНТ-комплексами помещались на 10 мин в растворы различных олигонуклеотидов (табл. 1). Затем датчик отмывался от несвязанного олигонуклеотида в течение 10 мин в воде при температуре 39 °С.

В *низкочастотной области* можно оценить возрастание доли проводящих ЛБ–УНТ-кластеров из-за выхода ON1 из ssДНК/мУНТ с образованием дуплексов dsДНК. Как видно на рис. 14, а, распознаваемые олигонуклеотиды, образуя дуплексы dsДНК, частично высвобождают мУНТ. Это приводит к уменьшению емкости в сторону значений емкости сенсора только с проводящими ЛБ–УНТ-кластерами. S-образная зависимость на рис. 14, а определяется кооперативным связыванием ON2 с ON1. Низкочастотное значение емкости сенсора с гомодуплексами ON1/ON2 оказывается наиболее смещенным к $C_{\text{мУНТ}}$ из-за эффекта расслоения фаз в фазовом переходе от ssДНК/мУНТ-комплексов к двухспиральной ДНК. Этот эффект уменьшается при образовании гетеродуплексов ON1/ON $_i$, $i = 3, 4, 5$.

Мы можем оценить величину дипольной поляризации dsДНК/мУНТ в *высокочастотной области*, где из-за больших релаксационных времен вклад максвелл-вагнеровской поляризации пренебрежимо мал. Это позволяет определить

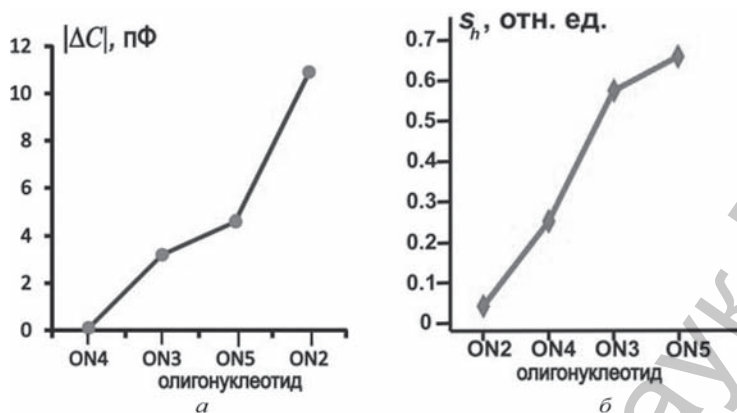


Рис. 14. а – Модуль низкочастотного изменения электрической емкости сенсора $|\Delta C|$, $\Delta C < 0$ из-за взаимодействия ON1 с олигонуклеотидами ON2, ON3, ON4, ON5; б – зависимость степени s_h гетерогенности сенсорного покрытия от типа олигонуклеотида на частоте ~ 700 кГц

степень гетерогенности s_h сенсорного покрытия через относительное содержание dsДНК/мУНТ по формуле

$$s_h = 1 - \frac{C_{dsДНК/мУНТ} - C_{мУНТ}}{C_{ssДНК/мУНТ} - C_{мУНТ}} = \frac{C_{ssДНК/мУНТ} - C_{dsДНК/мУНТ}}{C_{ssДНК/мУНТ} - C_{мУНТ}}$$

Здесь $C_{dsДНК/мУНТ}$ – электрическая емкость сенсора, покрытие которого содержит dsДНК/мУНТ. Как видно на рис. 14, б, наиболее гетерогенное покрытие получается для олигонуклеотида ON5 с одной ошибкой, когда высокочастотное значение $C_{dsДНК/мУНТ}$ определяется дипольной поляризацией собственно УНТ: $C_{dsДНК/мУНТ} \rightarrow C_{мУНТ}$. Это обусловлено компенсацией дипольных моментов нуклеотидных оснований в возникающей нуклеотидной паре. Число водородных связей между ssДНК/мУНТ и некомплементарным ON4 или олигонуклеотидом ON3 с тремя ошибками меньше, чем для ON5. Полный выход dsДНК из ON1/ON2/мУНТ в фазовом переходе к чисто олигонуклеотидной фазе сохраняет гомогенность покрытия, что выражается в близости высокочастотных значений $C_{dsДНК/мУНТ}$ и $C_{ssДНК/мУНТ}$ и, соответственно, s_h к нулю.

Заключение. Электрофоретический и структурный анализ ДНК/мУНТ-комплексов и изучение рамановского рассеяния света УНТ–ДНК-содержащими мицеллами показали, что происходит сильная компактификация однострочной ssДНК на карбоксилированных малостенных УНТ, модифицированных молекулами стеариновой кислоты. Методами диэлектрической и рамановской спектроскопии установлены экситонный механизм транспорта заряда и дальний (резонансный) перенос энергии в наноструктурных комплексах малостенных углеродных нанотрубок с ДНК. Предложен высокочувствительный метод для практического генотипирования однонуклеотидного полиморфизма ДНК на УНТ с электронноплотным самоорганизованным олигонуклеотидным покрытием.

Работа выполнена при финансовой поддержке БРФФИ, проект № Ф12РА-002.

Литература

1. Дмитриенко Е. В. и др. // Вестн. НГУ. Сер.: Биология, клиническая медицина. 2012. Т. 10, № 4. С. 166–180.
2. Красицкая В. В. и др. // Биоорг. химия. 2012. Т. 38, № 3. С. 342–350.
3. Arguello J. R. et al. // Nat. Genet. 1998. Vol. 18. P. 192–194.
4. Ganguly T. et al. // Hum. Genet. 1998. Vol. 102. P. 549–556.
5. Isacson J. et al. // Mol. Cell. Probes. 2000. Vol. 14. P. 321–328.
6. Nataraj A. et al. // Electrophoresis. 1999. Vol. 20. P. 1177–1185.
7. Kruglyak L., Nickerson D. // Nat. Genet. 2001. Vol. 27. P. 234–236.
8. Taillon-Miller, Kwok P. // Genome Res. 1999. Vol. 9. P. 499–505.
9. Cavalli-Sforza L. L. // Trends Genet. 1998. Vol. 14. P. 60–65.
10. Ha T. // Curr. Opin. Struct. Biol. 2001. Vol. 11. P. 287–292.
11. Sheng P. et al. // Chemical Communications. 2008. Vol. 41. P. 5128–5130.
12. Giesendorf B. et al. // Clin. Chem. 1998. Vol. 44. P. 482–486.
13. Sun X. // J. Biochips & Tissue chips. 2012. Vol. 2, N 1. P. 107.
14. Bansal J. et al. // J. Biosci. Bioengin. 2013. Vol. 115, N 4. P. 438–441.
15. Cardullo R. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. 1988. Vol. 85. P. 8790–8794.
16. Shakeel S. et al. // J. Chem. Technol. Biotechnol. 2006. Vol. 81. P. 892–899.
17. Wong M. L., Medrano J. F. // BioTechniques. 2005. Vol. 39. P. 75–85.
18. Van Hooijdonk E. et al. // Beilstein J. Nanotechnol. 2013. Vol. 4. P. 129.
19. Zhao X. et al. // J. Am. Chem. Soc. 2003. Vol. 125. P. 114–118.
20. Stoermer R. L., Keating C. D. // J. Am. Chem. Soc. 2006. Vol. 128. P. 13243.
21. Грушевский В. В. и др. Медико-социальная экология личности: состояние и перспективы. Материалы 10-й междунар. конф., 6–7 апр. 2012 г. Минск, 2012. С. 141–142.
22. Пleshko H. B. и др. IV конгресс физиков Беларуси: сб. науч. тр., Минск, 24–26 апр. 2013 г. Минск, 2013. С. 231–232.
23. Пleshko H. B. и др. Медико-социальная экология личности: состояние и перспективы. Материалы 11-й междунар. конф., 17–18 мая 2013 г. Минск, 2013. С. 218–221.
24. Grushevskaya H. V. et al. // Scientific J. Proc. Int. Conf. Nanomaterials: Applications and Properties. 2013. Vol. 2, N 4. P. 04NABM22.
25. Egorov A. S. et al. // J. Phys. CS. 2014.
26. Zhu Zh. et al. // Anal. Bioanal. Chem. 2010. Vol. 396. P. 73–83.
27. Li H. et al. // J. Mater. Chem. 2011. Vol. 21. P. 824–828.
28. Egorov A. S. et al. Foundations & Advances in Nonlinear Science. Materials of 14th Int. Conference – School. Minsk, 2012. P. 57–58.
29. Велигура А. А. и др. // Науч. вестн. Ужгородского ун-та. Сер. Физика. 2013. Вып. 32. С. 94–100.
30. Brush C. K. US Patent 5,583,236.
31. Tsourkas A. et al. // Nucleic Acids Res. 2003. Vol. 31. P. 1319–1330.
32. Hailong Li et al. // J. Mater. Chem. 2011. Vol. 21. P. 824–828.
33. Апарцин Е. К. и др. // Российские нанотехнологии. 2012. Т. 7, № 3–4. С. 38–45.
34. Хорунжая О. В. и др. // Біофізичний вісник. 2010. Вып. 24 (1). С. 5–13.
35. Egorov A. S. et al. // Nonlin. Phen. in Complex Sys. 2012. Vol. 15, N 2. P. 121–137.
36. Grushevskaya H. V. et al. // Nonlin. Phen. in Complex Sys. 2010. Vol. 13, N 4. P. 396–498.
37. Реагенты для молекулярной биологии [Электронный ресурс]. – Режим доступа: www.primetech.by.
38. Labunov V. A. et al. // Semiconductor Physics, Quantum Electronics & Optoelectronics. 2010. Vol. 2. P. 137–141.
39. Labunov V. A. et al. // Physica status solidi (a). 2010. P. 1–6.
40. Hursky L. I. et al. // Official Bulletin of the National Centre of Intellectual Property. 2013. Vol. 3 (92). P. 14.

41. *Grushevskaya H. V.* et al. // *J. Mod. Phys.* 2013. Vol. 4. P. 7–17.
42. *Kel'in A. V., Kulinkovich O. G.* // *Folia pharm. Univ. Carol.* 1995. Vol. 18 (supplementum). P. 96–97.
43. *Абрамов И. И.* и др. // *Петербургский журн. электроники.* 2012. № 4(73). С. 59–67.
44. *Грушевский В. В.* и др. // *Вестн. БГУ. Сер. 1: Физ. Мат. Информ.* 2012. № 2. С. 23–28.
45. *Абрамов И. И.* и др. *Microwave & Telecommunication Technology. Proceedings of 23rd Int. Crimean Conf., September 8–13, 2013, Sevastopol, Crimea, Ukraine; Moscow; Kiev, 2013.* P. 851–852.
46. *Ореховская Т. И.* и др. // *Современные методы и технологии создания и обработки материалов: сб. науч. тр.* 2013. Т. 1. С. 216–223.
47. *Утевский Л. М.* Дифракционная электронная микроскопия в металловедении. М., 1973. – 584 с.
48. *Хириш П.* и др. *Электронная микроскопия тонких кристаллов.* М., 1968. – 574 с.
49. *Кудрявцева Р. В., Павлов Д. А., Шляев П. А.* Геометрическая теория рассеяния ускоренных электронов на кристаллах. Н.Новгород, 2003. – 37 с.
50. *Анищик В. М., Понарядов В. В., Углов В. В.* Дифракционный анализ. Минск, 2002. – 185 с.
51. *Hirsh D. J.* et al. // *Biophysical Journal.* 1998. Vol. 75. P. 1858–1868.
52. *Li H.* et al. // *J. Mater. Chem.* 2011. Vol. 21. P. 824–828.
53. *Krylova H., Hurski L.* Spin polarization in strong correlated nanosystems. Saarbrücken, Germany, 2013. – 334 p.
54. *Приезжев А. В.* и др. *Лазерная диагностика в биологии и медицине.* М., 1989. – 240 с.
55. *Cooper D. R.* et al. // *ISRN Condensed Matter Physics.* 2012, Vol. 2012. ID 501686. 56 p.
56. *Morozov S. V., Novoselov K. S., Geim A. K.* // *Physics – Uspekhi.* 2008. Vol. 178. P. 776.
57. *Grushevskaya H. V., Krylov G.* // *Nonlin. Phen. in Compl. Sys.* 2014. Vol. 17, N 1. P. 86–96.
58. *Krylova H. V.* et al. // *Nonlin. Phen. in Compl. Sys.* 2010. Vol. 13, N 4. P. 334–351.
59. *Keldysh L. V.* // *Letters to JETP.* 1979. Vol. 29. P. 716.

A. S. EGOROV, V. P. EGOROVA, V. I. KROT, H. V. KRYLOVA, F. F. LAKHVICH, I. V. LIPNEVICH, T. I. OREKHOVSKAYA, A. A. VELIGURA, M. I. GOVOROV, B. G. SHULITSKI, V. S. ULASHCHIK

ELECTROCHEMICAL AND ELECTROPHORETIC DETECTION OF HYBRIDIZATION ON DNA/CARBON NANOTUBES: SNP GENETIC TYPING

Summary

In this paper one of most topical approaches to analysis of biochemical DNA-containing marker states is developed. It is to detect conformational changes of single-stranded (ss) DNA state after marker adhesion via a change of optical, electro-chemical properties of layered nanobioheterostructures. To do it, new complexes ssDNA with chemically modified and non-covalent functionalized carbon nanotubes (fWCNTs), which have few walls, where synthesized under self-assembly conditions. The complexification occurs in a process of electron-dense compactification DNA on fWCNTs. Effects CNT-enhanced compactification DNA where discovered by Raman and dielectric spectroscopy methods, structural analysis, and gel electrophoresis. One proposes to utilize thin films from ssDNA/fWCNT complexes as sensitive bionanoheterostructure in capacitive sensors. The results using this new method for genetic typing of single nucleotide polymorphism are represented.

НАУЧНЫЕ ОБЗОРЫ

УДК 533.9.07; 537.53

А. С. ЛОБКО

ЛАЗЕРНО-ПЛАЗМЕННОЕ УСКОРЕНИЕ ЗАРЯЖЕННЫХ ЧАСТИЦ: ПРИНЦИПЫ И ДОСТИЖЕНИЯ

Институт ядерных проблем БГУ

(Поступила в редакцию 23.07.2014)

В обзоре рассмотрен ряд аспектов одного из быстро развивающихся применений современных фемтосекундных лазеров нового поколения – создание лазерно-плазменных компактных ускорителей электронов и ионов высоких энергий. Обсуждены основные понятия и механизмы лазерного ускорения заряженных частиц, приведены параметры экспериментально полученных пучков, рассмотрены возможные варианты использования таких ускорителей в фундаментальных и прикладных исследованиях.

Введение. Впечатляющий прогресс, произошедший за последние годы в области создания мощных фемтосекундных лазеров, привел к тому, что в лабораториях стали доступны новые возможности генерации экстремальных состояний вещества [1; 2]. В частности, генерация сверхинтенсивных полей в лазерной плазме позволила добиться ускорения заряженных частиц с темпом, на несколько порядков большим, чем это удавалось ранее.

Традиционные методы и технологии ускорения (напр., [3; 4]), которые стали разрабатываться еще с 1930-х годов, развивались и шлифовались многие десятилетия и достигли известных всем успехов (ускорители Tevatron, LEP, LHC), к настоящему времени практически исчерпали себя. Физические принципы, заложенные в их основу, позволяли продвигаться к большим значениям энергии ускоренных частиц за счет наращивания размеров ускорительных установок, что выливается в итоге в их огромную стоимость при сооружении и существенные операционные расходы при эксплуатации. И если на сооружение уникальных установок типа Тэватрона или Большого адронного коллайдера LHC для изучения фундаментальных вопросов строения мироздания человечество еще может пойти, то отсутствие линейки компактных («настошных») и относительно доступных по цене ускорителей (так называемый дешевый пучок), способных обе-

спечить интенсивные пучки ионов, электронов и спектрально-яркие пучки перестраиваемого по энергии монохроматического рентгеновского излучения, пока существенно сдерживает развитие радиационных технологий и, в первую очередь, ядерной медицины.

Методы ускорения посредством коллективного взаимодействия заряженных частиц, реализуемого в лазерной плазме, свободны от многих принципиальных ограничений, присущих традиционным методам ускорения. Это связано прежде всего с тем фактом, что в плазме возможно создание ускоряющих полей с градиентами, которые на несколько порядков превышают ограниченные высоковольтным пробоем ускоряющие поля в традиционных ускорителях. Таким образом, если традиционные радиочастотные ускорители в каком-то смысле являются детищем радиофизики, то в новых условиях на авансцену выдвигаются лазерная физика и физика плазмы. Поскольку ускоритель как физическая установка является плодом творческих усилий физиков и инженеров разных специальностей, а как источник пучков и частиц вызывает интерес у еще много большего круга исследователей и пользователей – от индустрии и медицины до музейного дела и археологии – настоящая статья направлена на привлечение внимания достаточно широкой аудитории к этой перспективной в плане практического применения и богатой на фундаментальную физику тематике. Еще одним важным соображением является то, что лазерно-ускорительные установки могут базироваться на лазерах так называемого университетского класса, а не обязательно только на уникальных и самых передовых в мире по параметрам. Поскольку лазерно-плазменное ускорение прошло большой путь с 1979 г., когда оно было предложено Т. Таджимой и Дж. Доусоном [5], и к настоящему времени уже накоплено очень большое количество результатов, в данном обзоре рассматриваются лишь некоторые физические принципы и наиболее, на наш взгляд, яркие достижения. Очевидно, не все достойные обсуждения вопросы смогли быть упомянуты здесь в силу ограниченности возможного объема публикации.

Современные мощные твердотельные лазеры. Бурное развитие лазерных технологий, связанное с изобретением метода усиления частотно-модулированных (чирпированных) импульсов, привело к созданию лазерных систем, способных генерировать излучения мощностью, превышающей ПВт [6; 7]. При этом качество получаемого пучка позволило фокусировать их в пятно диаметром порядка нескольких длин волн, что обеспечивает значение интенсивности излучения на уровне 10^{22} Вт · см⁻². Применение принципа чирпирования позволило поднять интенсивность лазерного излучения на 5–6 порядков, радикально снизить размер и стоимость лазеров, ставших «настольными» устройствами (T³ lasers – Table-Top Terawatt lasers). Изучение механизмов взаимодействия столь интенсивного оптического излучения с веществом является фундаментальной задачей, стоящей перед физиками. Появление лазерной техники высоких плотностей энергии позволило перейти от изучения атомных и твердотельных про-

цессов к лабораторному изучению горячей плазмы, лазерной ядерной физике, физике высоких энергий и т. д. [1; 2].

Кратко напомним метод усиления чирпированных импульсов (Chirped Pulse Amplification – CPA). Идея метода, схематически представленного на рис. 1, заключается в том, что исходный изначально короткий лазерный импульс пропускается через стретчер – дисперсионную оптическую систему, придающую ему сильную линейную частотную модуляцию. При этом импульс оказывается растянутым во времени и пространстве за счет разнесения его спектральных компонент и имеет интенсивность, много меньшую по сравнению с первоначальной. Растянутый импульс усиливается обычным способом, обходя таким образом ограничение по оптическому пробое среды, и затем пропускается через вторую диспергирующую систему – компрессор. В качестве стретчера и компрессора обычно используют пару дифракционных решеток, определенным образом расположенных и ориентированных по отношению к оптическому пути импульса. Если традиционная техника позволяла фокусировать излучение линзами в двух перпендикулярных направлениях, то метод чирпирования делает фокусировку сразу в трех измерениях, резко повышая результирующую плотность мощности на выходе.

По усиливающей среде петаваттные лазеры делятся на три типа: неодимовое стекло, сапфир (корунд с титаном) и параметрические усилители (Optical Parametric Chirped Pulse Amplification – OPCPA) на кристаллах KDP и DKDP. Максимальная энергия достигается в лазерах на неодимовом стекле, поскольку запасенная в виде инверсии заселенностей энергия непосредственно преобразуется в чирпированный импульс. Однако узкая полоса усиления лазерных стекол с неодимом ограничивает длительность сжатого импульса на уровне нескольких

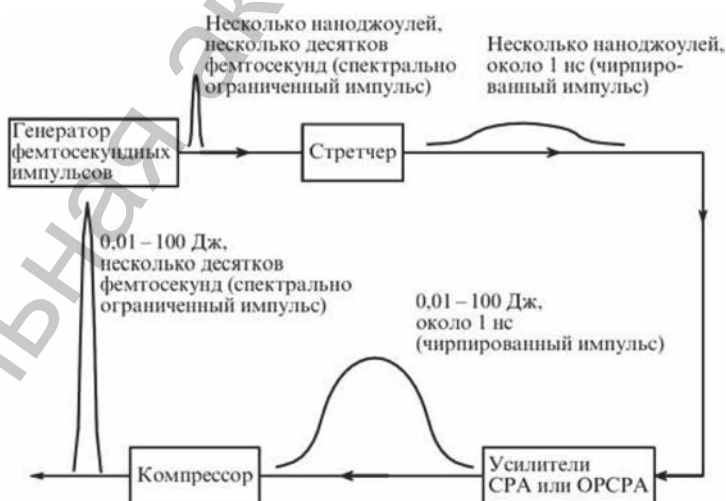


Рис. 1. Общая схема мощных фемтосекундных лазеров [7]

сотен фемтосекунд. В результате оптическая стойкость дифракционных решеток ограничивает продвижение в мультипетаваттный диапазон.

Изобилие новых физических явлений и возможных применений в петаватт-ном диапазоне стимулирует развитие большого количества лазерных проектов в мире, в том числе в Европе (напр., [8]) и в России [9]. В частности, европейский мегапроект ELI [8] предусматривает создание европейской лазерной инфраструктуры с центрами в Венгрии, Чехии и Румынии для решения задач физики сверх-сильных полей, аттосекундной физики, фотоядерной физики и создания лазерно-плазменных ускорителей и новых источников жестких излучений на их основе.

Движение электрона в лазерной волне. Релятивистские пороги электро-нов и ионов. Рассмотрим весьма упрощенно процессы ионизации и движения электронов в волне мощного лазерного импульса [10]. Для начала сравним электрическое поле интенсивного лазерного импульса с атомарными электрически-ми полями. Электрическое поле, действующее на первой боровской орбите атома водорода, равно

$$E_a = \frac{e}{a_b^2} = 5,1 \cdot 10^9 \text{ В} \cdot \text{см}^{-1}, \quad (1)$$

где $a_b = \frac{h^2}{mc^2} = 5 \cdot 10^{-9} \text{ см}$ – боровский радиус. Поле (1) соответствует следующей интенсивности лазерного импульса

$$I_a = \frac{cE_a^2}{8\pi} = 3,4 \cdot 10^{16} \text{ Вт} \cdot \text{см}^{-2}.$$

Итак, поле сильной лазерной волны может ионизировать атомы, причем конкретный механизм ионизации существенно зависит от интенсивности импульса. Для его определения важно значение безразмерного параметра адиабатичности Келдыша Γ [11]:

$$\Gamma^2 = \frac{U_i}{2\varepsilon_{os}},$$

где U_i – потенциал ионизации и $\varepsilon_{os} = \frac{eE(1 + \alpha^2)}{4m\omega^2}$ – энергия колебаний электрона в лазерном импульсе с электрическим полем E и несущей частотой ω ; α – степень поляризации лазерного импульса, соответственно $\alpha = 0$ для линейной поляризации и $\alpha = 1$ для циркулярной поляризации.

Для больших величин параметра Келдыша, $\Gamma \gg 1$, доминирует механизм многофотонной ионизации. В противоположном случае, когда $\Gamma \ll 1$, туннельная ионизация приводит к практически мгновенному высвобождению электрона и формированию плазмы. Известная простейшая квазиклассическая картина туннельной ионизации представима в виде механизма полевой надбарьерной ионизации. Электрон находится в первоначально невозмущенном потенциале атомного ядра на энергетическом уровне $-U_i$ (рис. 2, а). Электрическое поле ла-

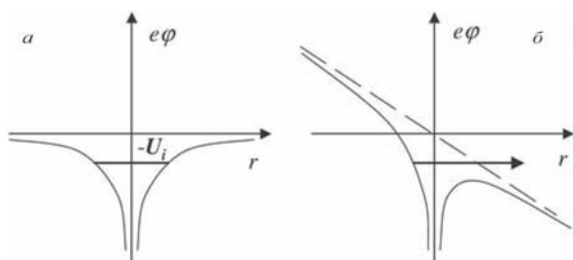


Рис. 2. Картина полевой ионизации: *a* – электрон находится на энергетическом уровне $-U_i$ в невозбужденном атоме в отсутствии внешнего поля; *б* – к веществу приложено сильное электрическое поле, возможен надбарьерный выход электрона [10]

зера может рассматриваться как статическое, потому что лазерная частота обычно много ниже, чем частоты атомных переходов. Лазерное поле деформирует потенциальный барьер, удерживающий электрон вблизи ядра. Когда лазерное поле достаточно сильно, барьер становится ниже величины энергии электрона, и он освобождается из атома (рис. 2, б).

Этот порог интенсивности лазерного излучения может быть рассчитан следующим образом:

$$I_{ion}(\text{Вт} \cdot \text{см}^{-2}) = \frac{4 \cdot 10^9 U_i^4 (\text{эВ})}{Z^2}, \quad (2)$$

где Z – заряд ядра. Очевидно, что рассмотренная модель квазиклассическая и весьма упрощенная. Следует напомнить, что существует квантовая туннельная подбарьерная ионизация, которая позволяет электрону покидать атом задолго до достижения порога (2). Подробно познакомиться с теорией лазерной ионизации можно по обзору [11]. Однако высота барьера быстро растет для электрических полей ниже величины порога и во многих практических случаях инженерная формула (2) дает удовлетворительную оценку.

Интенсивности, соответствующие полям (2), имеют значения ниже $10^{16} \text{ Вт} \cdot \text{см}^{-2}$ для электронов, занимающих внешние оболочки атомов. Это означает, что когда сверхинтенсивный лазерный импульс взаимодействует с веществом, ионизация происходит в начале взаимодействия, а центральная часть импульса взаимодействует уже с плазмой свободных электронов и ионов. Таким образом, взаимодействие электромагнитной волны со свободной заряженной частицей носит здесь фундаментальный характер.

Рассмотрим потенциал простейшей плоской электромагнитной волны, распространяющейся в положительном направлении вдоль оси Z :

$$\mathbf{a}(\zeta) = \mathbf{a}_0(\zeta) \cos k\zeta, \quad (3)$$

где $a = \frac{e\mathbf{A}}{mc^2}$ – релятивистски нормализованный векторный потенциал; $\zeta = z - ct$, $k = 2\pi / \lambda$, λ – длина волны. Используем кулоновскую калибровку и положим скалярный потенциал электромагнитной волны равным нулю, $\phi(\zeta) = 0$.

Потенциал волны (3) имеет две важных симметрии, каждая из которых приводит к интегралу движения, сохраняющемуся при перемещении заряженной ча-

стицы. Во-первых, потенциал (3) не зависит от поперечных координат. Как следствие, это приводит к сохранению обобщенного поперечного момента

$$\mathbf{P}_\perp = \mathbf{P}_\perp + \mathbf{a}mc = \text{const},$$

где $\mathbf{P}_\perp = m\gamma\mathbf{v}_\perp$ – кинетический момент и $\gamma = 1/\sqrt{1-(v/c)^2}$ – лоренц-фактор. Во-вторых, лазерный импульс – это волна, распространяющаяся с постоянной фазовой скоростью v_{ph} , которая в вакууме равна скорости света. Эта симметрия порождает второй интеграл движения:

$$W = K - p_z c = \text{const},$$

где $K = (\gamma - 1)mc^2$ – кинетическая энергия частицы.

Получив эти два интеграла, можно определить энергию и момент как функцию амплитуды лазерной волны. Пусть частица находится в покое, когда ее достигает лазерный импульс. В этом случае оба интеграла равны нулю и

$$p_z = \frac{p_\perp^2}{2mc},$$

$$K = \frac{a^2}{2} mc^2.$$

Из выражения для кинетической энергии K мы видим, что частица, колеблющаяся в лазерной волне, получает энергию, сравнимую с ее энергией покоя mc^2 , когда нормализованная амплитуда лазерной волны становится близкой к единице, $a_0 = 1$. Если нормализовать ее на массу электрона, то эта амплитуда соответствует интенсивности лазерного излучения

$$I_0 \lambda^2 = 1,37 \cdot 10^{18} \text{ Вт} \cdot \text{мкм}^2 \cdot \text{см}^{-2}.$$

Интенсивность I_0 обычно рассматривается как переходная к релятивистскому взаимодействию лазер-плазма (релятивистская оптика), потому что большие количества электронов в плазме начинают осциллировать с релятивистскими скоростями. Отметим, что релятивистская интенсивность I_0 зависит от длины волны как λ^{-2} . Это дает $10^{18} \text{ Вт} \cdot \text{см}^{-2}$ для лазера на стекле с $\lambda = 1 \text{ мкм}$ и всего $10^{16} \text{ Вт} \cdot \text{см}^{-2}$ для CO_2 лазера с $\lambda = 10 \text{ мкм}$.

Форму траектории частицы в плоской волне можно определить аналитически, если ввести «внутреннее время частицы» $s = \frac{\omega t}{\gamma}$. Для плоской волны с амплитудой a_0 линейной поляризацией в направлении X , траектория в нормализованных координатах (ζ, ξ, τ) имеет вид

$$\zeta = \frac{kz}{a_0^2} = \frac{1}{8}(2s - \sin 2s),$$

$$\xi = \frac{kx}{a_0} = \cos s,$$

$$\tau = ckt = s + \frac{a_0^2}{8}(2s - \sin 2s).$$

Эта траектория показана на рис. 3. Она автомодельная и не зависит от амплитуды лазерного поля в координатах (ζ, ξ, τ) . Однако при возвращении к физическим координатам видно, что существует значительная разница в движении частицы при нерелятивистской ($a \ll 1$) и релятивистской ($a > 1$) амплитудах поля.

Действительно, отклонение частицы в направлении поляризации пропорционально амплитуде лазерной волны, а в продольном направлении – квадрату амплитуды. Таким образом, при малых интенсивностях частицы осциллируют в основном в направлении поляризации с малым пондеромоторным сдвигом в направлении распространения лазерного импульса. При переходе в релятивистский режим движение частиц становится преимущественно продольным. Лазерная пондеромоторная сила $\mathbf{v}_\perp \times \mathbf{B}$ ускоряет их вдоль оси распространения импульса.

Правда следует отметить, что такое прямое лазерное ускорение электронов в вакууме достаточно неэффективно. Средняя ускоряющая сила (F), действующая на релятивистскую частицу в вакууме, насыщается на уровне $F / mc\omega < 2$. Причиной этого является зависимость поперечной скорости от нормированной амплитуды волны. При нерелятивистских интенсивностях она вначале растет $v_\perp / c \sim a_0$ для $a_0 \ll 1$, затем достигает максимума на a_0 и далее спадает обратно пропорционально амплитуде, $v_\perp / c \sim 1 / a_0$ для больших a_0 . Как следствие, пондеромоторная сила $\mathbf{v}_\perp \times \mathbf{B}$ далее не возрастает вне зависимости от интенсивности лазерного импульса.

Кроме того, лазерные импульсы при экстремальных интенсивностях сильно сфокусированы, а не являются плоскими волнами. Сфокусированная волна имеет не только поперечные, но и продольные компоненты векторного потенциала. Это приводит к тому, что когда сфокусированный лазерный импульс взаимодействует с частицами в вакууме, они рассеиваются от фокусного пятна.

Рассмотренный механизм прямого лазерного ускорения генерирует ускоренные электроны со спектром, имеющим форму, близкую к распределению Больцмана. Однако будущие применения (например, в физике высоких энергий и ядерной медицине) требуют пучков намного лучшего качества, т. е. (квази)-моноэнергетических и с малой угловой расходимостью. Такие пучки могут генерироваться лазером в плазме с использованием другого механизма ускорения: ускорение в плазменной кильватерной волне, который будет более подробно рассмотрен далее.

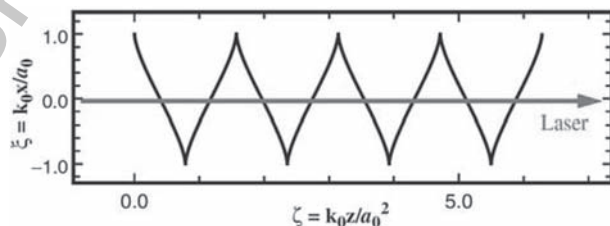


Рис. 3. Автомодельная траектория электрона в плоской электромагнитной волне [10]

Что касается ионов, они значительно тяжелее электронов, поэтому достигают релятивистского режима много позднее. Например, для протонов можно оценить интенсивность следующим образом:

$$I_p = \left(\frac{M_p}{m} \right)^2 I_0 \approx 5 \cdot 10^{24} \text{ Вт} \cdot \text{мкм}^2 \cdot \text{см}^{-2}.$$

Эта интенсивность даже для протонов пока превышает технически доступные на сегодняшний день значения. При «электронной» релятивистской интенсивности протон осциллирует в лазерном поле с энергией порядка сотни электрон-вольт. Таким образом, ускорение ионов в настоящее время возможно только как вторичный процесс, т. е. в плазменных полях индуцированных разогретыми лазерным импульсом электронами.

Ускорение электронов в плазменной волне. Размеры современных радиочастотных ускорителей электронов определяются напряженностью ускоряющего поля, которая составляет 10^7 – $10^8 \text{ В} \cdot \text{м}^{-1}$ и ограничена пробоем в резонаторной ускоряющей системе. Уже достаточно давно начал обсуждаться вопрос об ускорении частиц не в вакууме, а в плазме [5]. В этом случае, с одной стороны, отсутствует ограничение, обусловленное пробоем, а с другой – напряженность электрического поля в релятивистской волне плотности заряда (фазовая скорость которой близка к скорости света) может достигать огромных величин. Действительно, оценка [1, с. 126] с помощью уравнения Пуассона позволяет связать эту напряженность с концентрацией электронов плазмы n_e :

$$E \cong \alpha (n_e [\text{см}^{-3}])^{1/2} [\text{В} \cdot \text{см}^{-1}],$$

где $\alpha = \delta n / n_e$ – безразмерная амплитуда плазменной волны (δn – амплитуда колебаний плотности электронов). При плотности электронов $n_e = 10^{17} \text{ см}^{-3}$ и $\alpha = 0,3$, напряженность ускоряющего поля в плазменной волне составляет $10^8 \text{ В} \cdot \text{см}^{-1}$, что на два-три порядка превышает темпы ускорения даже в лучших традиционных радиочастотных ускорителях.

Общая идея ускорения заряженных частиц мощными лазерными импульсами при их взаимодействии с плазмой, впервые предложенная в [5], заключается в следующем. Лазерный импульс, распространяясь в прозрачной плазме, оказывает пондеромоторное воздействие на электроны вдоль направления своего распространения и индуцирует тем самым колебания плазмы, которые проявляются в виде кильватерной плазменной волны. В этой плазменной волне существует продольное электрическое поле, в котором есть как фазы ускорения, так и фазы торможения. Поскольку зоны ускорения перемещаются с фазовой скоростью, равной групповой скорости лазерного импульса в плазме и близкой к скорости света, то электроны, попавшие в фазу ускорения и движущиеся с релятивистской скоростью в направлении распространения лазерного импульса, могут оставаться в ускорительной фазе относительно долгое время, приобретая тем самым значительную энергию (рис. 4). Такие электроны называют захваченными, а предел набора энергии определяется длиной дефазировки.

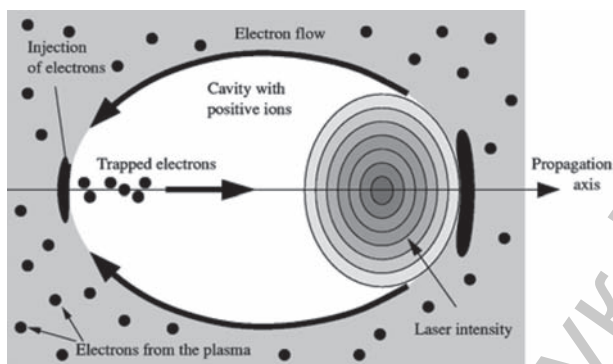


Рис. 4. Ускорение в кильватерной волне лазерного импульса в плазме [21]

Одной из основных проблем в этом режиме является загрузка или захват электронов в ускоряющую фазу поля. Обычно захватываемый заряд не превышает 10 нКл, имеет больцмановское распределение и температуру порядка нескольких МэВ ($\sim 10^2$ К). При этом новый захват ограничивается уже захваченными электронами ввиду наличия кулоновских сил отталкивания. Предпринимаются различные способы решения проблемы инжекции: инжекция из внешнего источника (технически очень сложная задача для традиционной ускорительной физики); создание условий захвата с помощью второго лазерного импульса [12] (рис. 5); использование неоднородной плазмы с градиентом плотности [13] и т. д.

Рассмотрим схему механизма автоинъекции в (сильно нелинейном) режиме электронного пузыря. На рис. 5, а представлена диаграмма распределения плотности электронов плазмы за лазерным импульсом.

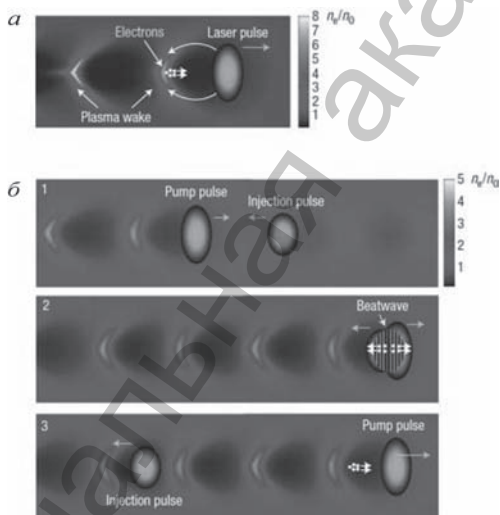


Рис. 5. Некоторые схемы инжекции в лазерно-плазменных ускорителях [12]

плотности электронов плазмы за лазерным импульсом. Плазменная волна сильно нелинейна и имеет области, откуда электроны удалены (на рисунке – темные) и области, где электроны сконцентрированы (на рисунке – светлые). Стрелками показано как электроны перемещаются наружу и потом собираются в задней части кильватерной волны, где некоторые из них захватываются и ускоряются. На рис. 5, б показана диаграмма инжекции в схеме с двумя сталкивающимися импульсами. На рис. 5, б (1) два лазерных импульса еще не столкнулись, импульс накачки создает сильную плазменную волну, однако не столь сильно нелинейную, как в случае режима электронного пузыря. На рис. 5, б (2)

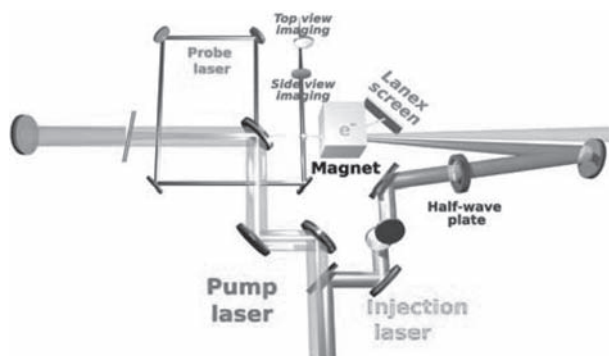


Рис. 6. Экспериментальная схема с двумя лазерными пучками, распространяющимися под углом 176° и ускоряющими электроны в плазменной мишени в виде ультразвуковой газовой струи [14]

импульсы сталкиваются, и их интерференция создает биение поля, которое предускоряет электроны. На рис. 5, б (3) некоторые из предварительно ускоренных электронов захватываются и далее ускоряются в кильватерной волне.

Среди наиболее впечатляющих результатов с точки зрения качества и возможностей управления параметрами пучка в экспериментах по ускорению электронов можно указать на результаты, полученные в схеме (рис. 6, рис. 7).

Таким образом, прогресс в лазерно-плазменном ускорении электронов позволяет утверждать, что параметры пучков уже близки к необходимым для их применения в различных схемах генерации жестких излучений. Целью всегда ставится получение компактных («настоельных») интенсивных источников (квази-)монохроматических ионизирующих излучений с перестраиваемой энергией фотонов, которые позволят, например, использовать радиационные технологии, применимые пока только на синхротронных световых источниках. Перечислим параметры этих пучков:

энергия пучка до 400 МэВ и dE / E порядка 1 %;

возможность перестройки энергии излучения;

короткий импульс электронов порядка 1,5 фс;

слабая угловая расходимость порядка 2 мрад.

Конечно, здесь следует уточнить, что в рассматриваемых процессах ускоряются короткие сгустки (банчи) электронов с зарядом порядка десятка пКл, что не может

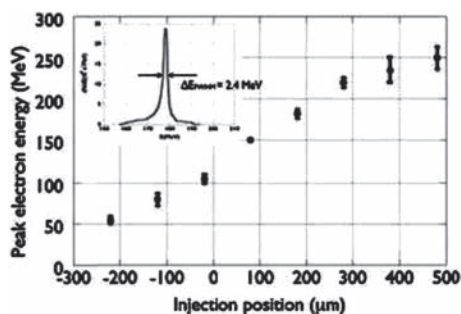


Рис. 7. Энергия электронного пучка как функция расположения точки столкновения лазерных импульсов внутри газовой мишени. На врезке показано, что энергетический разброс порядка 1,3 %. Точка 0 мкм соответствует середине газовой струи, а точка 500 мкм соответствует ранней инжекции на входе в струю газа [15]

обеспечить большой средний ток (пока частота работы мощных лазерных систем не превышает нескольких десятков герц) и, как следствие, существенную интенсивность выходного излучения. Однако весьма вероятно усиление генерируемой интенсивности в некоторых радиационных механизмах из-за коллективных эффектов в силу очень коротких импульсов тока.

Весьма перспективным выглядит полностью оптический короткоимпульсный источник высокоэнергетического гамма-излучения на основе обратного комптоновского рассеяния (рис. 8). На рис. 8, *a* интенсивный фемтосекундный лазерный импульс фокусируется на гелиевой струйной мишени толщиной порядка миллиметра, индуцирует в ней кильватерную полость, в которой захватываются и ускоряются электроны. За газовой мишенью нормально к осям лазерного импульса и электронного пучка располагается твердая мишень (например, стекло толщиной 1,0 мм). Мишень ионизируется фронтом импульса и превращается в плазменное зеркало, эффективно (лучше чем 70 % при $a_0 \geq 0,04$) отражающее ла-

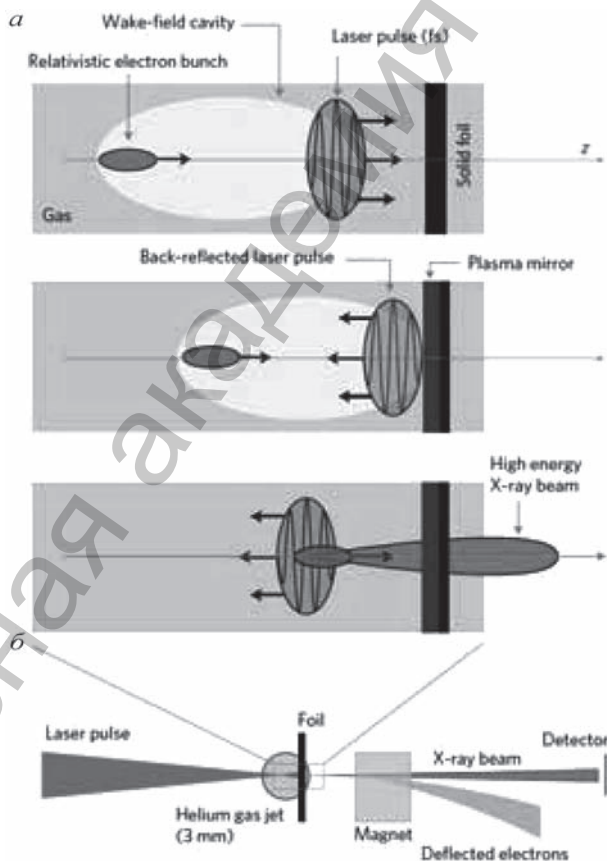


Рис. 8. Полностью оптический гамма-источник: *a* – формирование условий обратного комптоновского рассеяния; *б* – упрощенная экспериментальная схема [16]

зерный импульс. Такой подход позволяет связать в пространстве и времени встречные импульсы лазерного излучения и релятивистских электронов для обеспечения условий обратного комптоновского рассеяния. На рис. 8, б показана упрощенная схема эксперимента. Измеренный заряд банча электронов, ускоренного в кильватерном режиме, составлял 120 пКл. Энергия и интенсивность полученного гамма-излучения показана на рис. 9.

В недавно опубликованной работе [17] при демонстрации полностью лазерного (100 ТВт) комптоновского гамма-источника были получены гамма-кванты 50 %-ной монохроматичности с перестраиваемой энергией в диапазоне 70 кэВ–1 МэВ. Его спектральная яркость оценивается величиной $\sim 3 \cdot 10^{18}$ фотон $\text{с}^{-1} \text{мм}^{-2} \text{мрад}^{-2} / 0,1 \% \lambda$ для пучка с энергией 70 кэВ и $\sim 1 \cdot 10^{19}$ для пучка с энергией 1,0 МэВ. Такие величины конкурентны со спектральными яркостями синхротронных световых источников 3-го поколения (с ондуляторами или вигглерами) [18] при «настоельных» габаритах лазерной установки-генератора. Количество фотонов было порядка двух миллионов в импульсе, что при существующей частоте следования лазерных импульсов пока не обеспечивает нужных для применения интенсивностей пучка.

Лазерное ускорение ионов. Ускорение атомарных ионов в фемто- и пикосекундной лазерной плазме – вторичный процесс, обусловленный возникновением больших квазистатических полей, вызванных пространственным разделением зарядов (рис. 10). Электроны распространяются преимущественно вперед, за задней поверхностью тонкой (несколько нанометров) мишени. За ними следуют ионы, ускоряющиеся в поле виртуального катода. Кроме того, релятивистская плазма генерирует интенсивное электромагнитное излучение и некоторые вторичные частицы, преимущественно нейтроны.

Подробное описание многочисленных деталей лазерного ускорения, в целом, и лазерного ускорения ионов, в частности, выходит далеко за рамки данной публикации. Поэтому, как и в случае с ускорением электронов, ограничимся лишь некоторыми иллюстрациями экспериментального прогресса, достигнутого к настоящему времени. Подробности же могут быть найдены, например, в [19; 20] и цитированной там литературе.

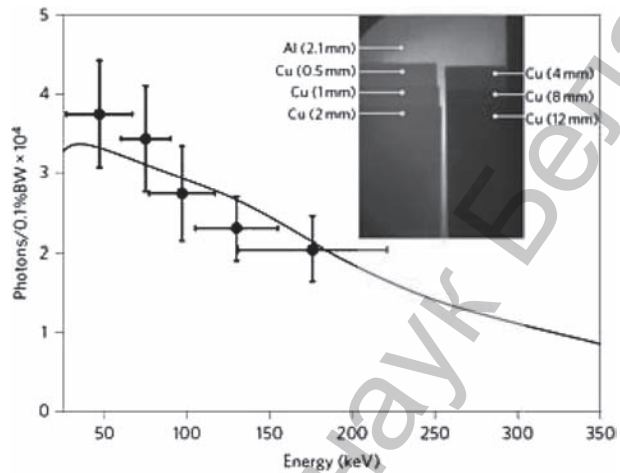


Рис. 9. Энергия и интенсивность полностью оптического источника гамма-излучения [16]

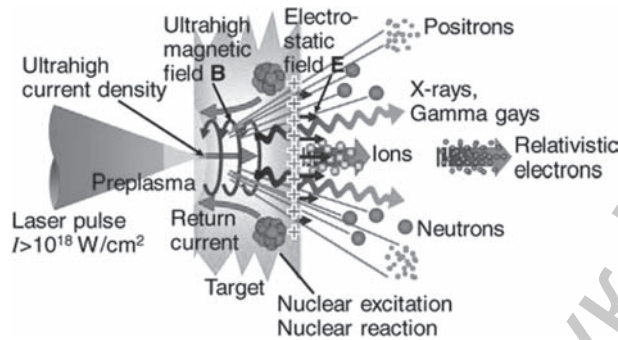


Рис. 10. Схема генерации частиц и излучений в лазерной плазме [19]

Общим для всех механизмов лазерного ускорения является требование к лазерной системе иметь мощность в импульсе порядка петаватта. Наряду с обеспечением соответствующей энергии и длительности импульса, важно также получить минимальные размеры фокального пятна, что наряду с мощностью определяет интенсивность импульса, а значит и доступную энергию ускорения ионов в большинстве режимов ускорения. Достижимый размер фокального пятна ограничивается дифракцией и искажениями волнового фронта, при этом уже продемонстрировано значение 0,9 мкм FWHM, полученное с помощью эллиптического плазменного зеркала [19].

Для ускорения ионов очень важной является временная форма лазерного импульса, особенно его контраст. Ввиду сложной формы сверхинтенсивного импульса (рис. 11, справа), варианты его взаимодействия с твердой мишенью (фольгой) субмикронной толщины, необходимой для генерации ионов, может рассматриваться как взаимодействие с «низким», «нормальным» или «высоким» контрастом. «Низкий» контраст означает, что мишень подвергается существенному влиянию и может быть повреждена или даже испарена из-за воздействия предимпульса или пьедестала усиленного спонтанного излучения (amplified spontaneous emission – ASE). «Нормальный» контраст означает, что свет, предшествующий основному импульсу, не приводит к полному разрушению тонкой мишени, но относительно большое количество предплазмы (рис. 11, слева) появляется на фронтальной части мишени существенно раньше прихода основного импульса и формируя плазменное зеркало, существенно снижает эффективность взаимодействия (т. е. уменьшает величину ускоряющего ионы поля). «Высокий» контраст означает, что предплазма не появляется либо возникает прямо

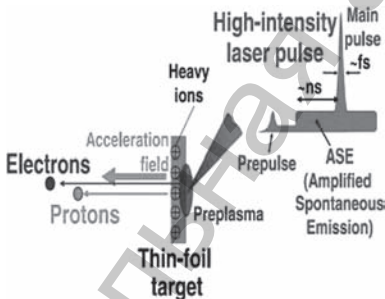


Рис. 11. Типичная временная структура лазерного импульса высокой интенсивности (справа сверху) и его взаимодействие с тонкой мишенью (слева внизу) [19]

перед основным импульсом, что уже не производит большого влияния на взаимодействие. Таким образом, формирование высококонтрастных импульсов лазерного излучения петаваттной мощности является одной из важнейших задач для лазерной физики в применении к ускорению ионов. Чем более высокий будет достигнут контраст (например, 10^{10} и более), тем более тонкие (наноразмерные) мишени можно применять, что соответственно приведет и к более высоким энергиям ускоренных ионов. Отметим, что точное измерение контраста также пока не является полностью решенной экспериментальной задачей.

Еще одной важнейшей проблемой является интенсивность получаемых пучков, непосредственно связанная с достижимой частотой повторения лазерных импульсов сверхвысокой интенсивности. В настоящее время она имеет значение порядка 10 Гц и менее. Потенциально увеличить скорость следования импульсов можно в технологиях с твердотельными лазерами с диодной накачкой. Чтобы сравниться по току пучка (~ 1 мА) с современными радиочастотными ускорителями, потребуется частота в несколько кГц с высокой стабильностью параметров импульсов.

Например, для применения в терапии раковых заболеваний пучки должны иметь следующие параметры: адаптируемая энергия протонов ~ 250 МэВ или ~ 400 МэВ/нуклон для легких ионов; ~ 1 % разброс по энергии; интенсивность $\sim (1-5) \cdot 10^{10}$ частиц/с [21]. Эти величины должны быть достигнуты с помощью относительно компактного лазера, имеющего стоимость, конкурентную по сравнению со стоимостью современного радиочастотного ускорителя. Кроме того, потребуется разработка соответствующих мишенных узлов с высокочастотной подачей и юстировкой тонких одноразовых мишеней. Дополнительно, система обратной связи в реальном времени, выполняющая мониторинг и управления параметрами лазера, плазмы и пучка, станет одним из ключевых компонентов системы лазерного ускорения для применения в медицине или промышленности.

Рассмотрим в качестве примера некоторые результаты эксперимента по лазерному ускорению протонов и ионов углерода [22], демонстрирующие высокую чувствительность механизма ускорения к оптимальной толщине мишени. На рис. 12 показаны спектры квази-моноэнергетических протонов, полученные на алмазных мишенях толщиной 5, 42 и 50 нм.

Видно, что уже при толщине мишени 50 нм электроны, выбитые лазерным импульсом с задней поверхности мишени, не создают компрессированный слой, формирующий виртуальный катод и, как следствие, спектр протонов имеет приблизительно экспоненциальную форму с некоторыми модуляциями. Кроме того, толщина мишени имеет явный оптимум и в чрезмерно тонкой мишени ускорение останавливается слишком рано. Анализ и расчеты [22] показали, что интенсивность использованного лазера $I_0 = 2 \cdot 10^{20}$ Вт/см² пока еще недостаточна для генерации более высокомонохроматического пучка протонов, необходимого для возможных будущих применений. Повышение интенсивности и контраста сверх-

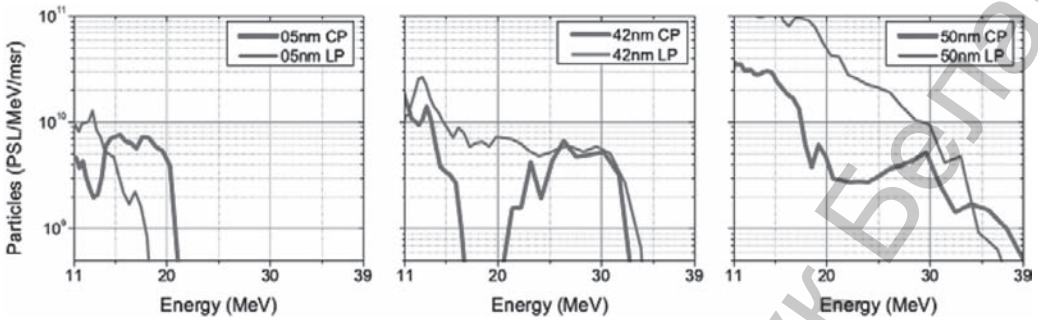


Рис. 12. Спектры протонов, полученные на мишенях различной толщины при циркулярной CP (жирные кривые) и линейной LP (тонкие кривые) поляризациях лазерного импульса [22]

интенсивных лазерных импульсов остаются основными задачами лазерного ускорения ионов.

Новая структура импульсного лазера с высокой средней мощностью – CAN. Итак, основным сдерживающим фактором в практическом развитии лазерно-плазменных методов ускорения и связанных с ними разработок является существующее в настоящее время технологическое ограничение средней мощности импульсного лазерного излучения. В качестве одной из новых идей для преодоления этого ограничения можно упомянуть международный консорциум CAN (Coherent Amplification Network – сеть когерентного усиления) [23; 24], предлагающий использование когерентного сложения сигналов нескольких тысяч волоконных лазеров с диодной накачкой, уже коммерчески доступных и применяемых в технике телекоммуникаций. Целью проекта является создание импульсного лазера (кпд 30–50 %) с выходной энергией 32 Дж при частоте повторения

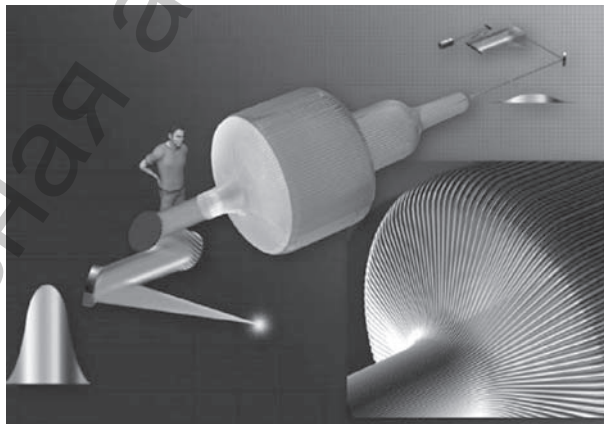


Рис. 13. Концепция волоконного CAN-усилителя в схеме усиления chirпированных импульсов [23]

импульсов 15 кГц, что дает среднюю мощность излучения примерно 500 кВт и пиковую мощность 240 ТВт. Концепция проекта CAN показана на рис. 13, а обсуждение проблем и последних достижений приведено в [25], где данный подход представляется как новая парадигма в генерации фемтосекундных лазерных импульсов с высокой средней мощностью.

Ключевой проблемой в реализации такой концепции является разработка технических возможностей активного управления фазами группы импульсных волоконных лазеров с целью когерентного сложения их полей в дальней зоне. Основная сложность состоит в необходимости управления не только фазовой, но и групповой задержками. Разрабатывается достаточно много различных подходов, один из которых недавно продемонстрировал успешное когерентное сложение выходных полей 64 независимых волоконных усилителей [26]. Экспериментальная установка состояла из матрицы коллимированных волоконных световодов, наборов быстродействующих фазовых модуляторов и анализатора волнового фронта QWLSI, специально разработанного для этого применения (рис. 14).

Утверждается, что такая адаптивная архитектура, базируемая на активном управлении фазой волны каждого из световодов с помощью компактных матриц электрооптических PLZT-модуляторов, имеет потенциал масштабирования до большего (вплоть до 10^4) количества управляемых каналов. Для этого необходимо повысить быстродействие измерительного канала с помощью камеры высокого разрешения и более быстрых каналов обратной связи.

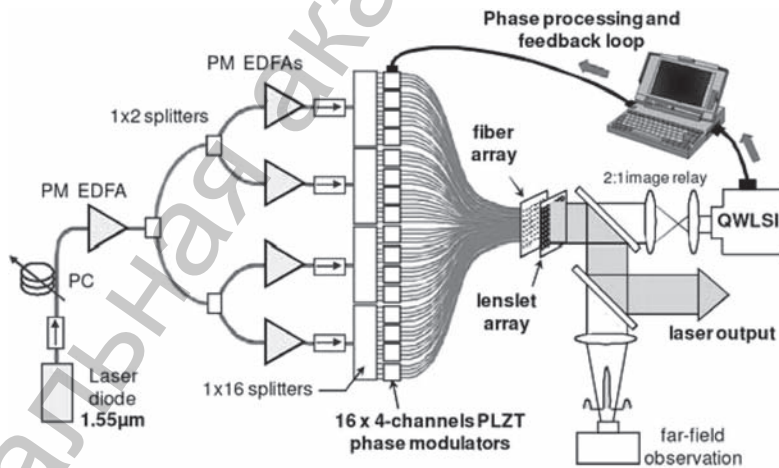


Рис. 14. Экспериментальная установка (PC – контроллер поляризации; PM EDFA – активированный эрбием волоконный усилитель с поддержкой фазы; QWLSI – четырехволновой интерферометр поперечного сдвига) [26]

Оценка стоимости системы CAN, сделанная на основании ряда «реалистичных» допущений в [24], приводит авторов к величине в 20 M\$ для лазера с энергией 30 Дж и частотой повторения импульсов 10 кГц.

Заключение. Для того чтобы еще раз подчеркнуть перспективность работ по лазерно-плазменному ускорению, кратко перечислим возможные (фундаментальные и практические) применения лазерно-ускоренных частиц [1; 2]:

инжекторы для традиционных радиочастотных ускорителей частиц (электронов и ионов);

протонная радиография, например, зондирование сильных полей в мишенях инерционного термоядерного синтеза;

«быстрый» поджиг мишени инерционного термоядерного синтеза;

получение короткоживущих изотопов, например, для позитронной эмиссионной томографии, которые получают сейчас на медицинских циклотронах;

коротко-импульсные источники нейтронов, например, для диагностики быстропротекающих процессов в плотных средах;

генерация жесткого электромагнитного излучения;

ионная имплантация;

фундаментальные эксперименты в области физики экстремальных состояний и ядерной физики, например, исследования по трансмутации долгоживущих изотопов;

лазерная адронная радиационная терапия и т. д.

Очевидно, что исследования в этой области не только находятся на переднем крае науки, но и являются междисциплинарными. Таким образом, ученые многих специальностей могут найти свою нишу в этих исследованиях, так как здесь находится стык лазерной физики, теоретической физики, физики плазмы, физики ядра и элементарных частиц, материаловедения, теории и практики ускорения заряженных частиц, научного приборостроения. Коллективный характер взаимодействия частиц и полей в лазерно-плазменных экспериментах ставят весьма серьезные проблемы при проведении численных экспериментов и, следовательно, требуют привлечения специалистов по высокопроизводительным вычислениям и использования соответствующей суперкомпьютерной техники.

С точки зрения применений просматриваются интересы физиков, химиков, медиков и биологов, разработчиков и промышленных пользователей радиационных технологий. Именно отсутствие компактных ускорителей электронов и ионов тормозит широкое применение многих, уже в достаточной степени зрелых и отработанных на больших ускорителях и синхротронных световых источниках, ядерно-медицинских и радиационных технологий. При определенной консолидации сил белорусских ученых, возможно, именно исследования в области лазерно-плазменного взаимодействия могли бы стать одним из тех больших проектов, которые способны поддержать развитие естественных наук в нашей стране и вывести их на конкурентный международный уровень.

Литература

1. *Фортв В. Е.* Экстремальные состояния вещества. М.: ФИЗМАТЛИТ, 2009. – 304 с.
2. Laser-plasma interactions / eds. D. A. Jaroszynsky, R. Bingham, R. A. Cairns. Boca Raton, London, New York: CRC Press, 2009. – 427 p.
3. *Humphries S.* Principles of charged particle acceleration. New York: J. Wiley and Sons, 1999. – 578 p.
4. *Лебедев А. Н., Шальнов А. В.* Основы физики и техники ускорителей. М.: Энергоатомиздат, 1991. – 528 с.
5. *Tajima T., Dawson J. M.* Laser electron accelerator // *Phys. Rev. Lett.* 1979. Vol. 43. P. 267–270.
6. *Коржиманов А. В.* и др. Горизонты петаваттных лазерных комплексов // УФН. 2011. Т. 181, № 1. С. 9–32.
7. *Хазанов Е. А., Сергеев А. М.* Петаваттные лазеры на основе оптических параметрических усилителей: состояние и перспективы // УФН. 2008. Т. 178, № 9. С. 1006–1011.
8. Extreme Light Infrastructure: Report on the Grand Challenges Meeting (27-28 Apr. 2009, Paris) / eds. G. Korn, P. Antici. Paris, 2009. – 98 p.
9. *Сергеев А. М.* Экстремальные световые поля [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://theor.mephi.ru/sem/school-12/sergeev/%d1%e5%f0%e3%e5%e2%20-%20f8%ea%ee%eb%e0%20%cc%8%d4%e8.pdf>.
10. *Pukhov A.* Strong field interaction of laser radiation // *Rep. Prog. Phys.* 2003. Vol. 66. P. 47–101.
11. *Попов В. С.* Туннельная и многофотонная ионизация атомов и ионов в сильном лазерном поле (теория Келдыша) // УФН. 2004. Т. 174, № 9. С. 921–951.
12. *Malka V., Faure J., Gauduel Y.* et al. Principles and applications of compact laser–plasma accelerators // *Nature Physics.* 2008. Vol. 4. P. 447–453.
13. *Malka V.* Laser plasma accelerators // *Phys. Plasmas.* 2012. Vol. 19. P. 055501 (11 PP).
14. *Malka V., Faure J., Rechatin C.* et al. Laser-driven accelerators by colliding pulses injection: A review of simulation and experimental results // *Phys. Plasmas.* 2009. Vol. 16. P. 056703 (7 PP).
15. *Malka V.* Laser plasma accelerator research activities at LOA // *J. Intense Pulsed Lasers & Appl. in Adv. Physics.* 2012. Vol. 2. P. 23–29.
16. *Ta Phuoc K., Corde S., Thauray C.* et al. All-optical Compton gamma-source // *Nature Phot. Lett.* 2012. DOI: 10.1038/NPHOTON.2012.82.
17. *Powers N. D., Ghebregziabher I., Golovin G.* et al. Quasi-monoenergetic and tunable X-rays from a laser-driven Compton light source // *Nature Phot.* 2013. DOI:10.1038/NPHOTON.2013.314.
18. *Фетисов Г. В.* Синхротронное излучение. Методы исследования структуры веществ / под ред. Л. А. Асланова. М.: ФИЗМАТЛИТ, 2007. – 672 с.
19. *Daido H., Nishiuchi M., Pirozhkov A. S.* Review of laser-driven ion sources and their applications // *Rep. Prog. Phys.* 2012. Vol. 75. P. 056401 (71 PP).
20. *Mourou G., Tajima T., Bulanov S. V.* Optics in the relativistic regime // *Reviews of Modern Physics.* 2006. Vol. 78. P. 309–371.
21. *Glinec Y., Faure J., Malka V.* et al. Radiotherapy with laser-plasma accelerators: Monte Carlo simulation of dose deposited by an experimental quasimonoenergetic electron beam // *Med. Phys.* 2006. Vol. 33, N 1. P. 155–162.
22. *Jung D.* Ion acceleration from relativistic laser nano-target interaction // Dissertation. Ludwig Maximilians Universität München, 2012. – 170 p.
23. *Mourou G., Huĭn D., Galvanauskas A.* The road to high peak power and high average power lasers: Coherent Amplification Network (CAN) // *AIP Conf. Proc.* 2006. Vol. 827. P. 152–163.
24. *Mourou G., Tajima T., Quinn M.* et al. Are fiber-based lasers the future of accelerators? // *Nucl. Instr. Meth.* 2014. Vol. A740. P. 17–20.
25. *Brocklesby W. S., Nilsson J., Schreiber T.* et al. ICAN as a new laser paradigm for high energy, high average power femtosecond pulses // *Eur. Phys. J. Special Topics.* 2014. Vol. 223. P. 1189–1195.
26. *Bourderionnet J., Bellanger C., Primot J., Brignon A.* Collective coherent phase combining of 64 fibers // *Opt. Express.* 2011. Vol. 19, N 18. P. 17053–17058.

A. S. LOBKO

**LASER PLASMA ACCELERATION OF CHARGED PARTICLES: CONCEPTS
AND ACHIEVEMENTS**

Summary

The paper reviews some aspects of one of the rapidly developing applications of up-to-date femtosecond lasers – table-top laser plasma accelerators of electrons and ions. Main conceptions and mechanisms of laser acceleration are discussed, experimentally achieved beam parameters are given as examples, feasible fundamental and applied applications of developing accelerators are considered.

ВЕСТНИК ФОНДА ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ, № 3, 2014
на русском и белорусском языках

Редактор Т. П. Петрович
Компьютерная верстка Л. И. Кудерко

Подписано в печать 23.09.2014. Выход в свет 29.09.2014. Формат 70 × 100¹/₁₆. Бумага офсетная.
Печать цифровая. Усл. печ. л. 8,78. Уч.-изд. л. 7,1. Тираж 126 экз. Заказ 162.

Цена номера: индивидуальная подписка – 36549 руб.; ведомственная подписка – 36549 руб.

Издатель и полиграфическое исполнение:
Республиканское унитарное предприятие «Издательский дом «Беларуская навука».
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя, распространителя
печатных изданий № 1/18 от 02.08.2013. ЛП № 02330/455 от 30.12.2013.
Ул. Ф. Скорины, 40, 220141, Минск.