

## ОБОРЫ АКТУАЛЬНЫХ ПРОБЛЕМ

Динамическая фазовая микроскопия:  
возможен ли "диалог" с клеткой?

В.П. Тычинский

*Метаболическая компонента рефрактерности рассматривается в качестве параметра для количественной оценки "жизнеспособности" клеток и органелл. Показана возможность исследования внутриклеточных процессов методом динамической фазовой микроскопии (ДФМ), который дает в реальном времени информацию в виде локальных изменений оптической разности хода. Предварительные результаты показали возможность локализации "сигналов", получения информации по схеме сигнал–структура–функция и перспективу "диалога" с клеткой путем регистрации в реальном времени ее отклика на изменения внешних условий. Механизм зависимости рефрактерности от метаболизма объясняется вкладом молекул связанной воды.*

PACS numbers: 07.60.–j, 87.16.–b, 87.64.–t

## Содержание

1. Введение (535).
  2. Обзор оптических методов исследований внутриклеточной динамики (536).
  3. Когерентный фазовый микроскоп "Эйрискан", метод динамической фазовой микроскопии (537).
  4. Результаты измерений морфологии органелл и клеток (540).
  5. Регистрация метаболических сигналов в клетках (543).
  6. Механизмы метаболической зависимости рефрактерности (547).
  7. Проблемы "языка" клетки, "диалога" и биологической интерпретации сигналов (549).
  8. Заключение (551).
  9. Приложение (551).
- Список литературы (552).

## 1. Введение

Известно, что познание окружающих нас природных явлений наиболее продуктивно при возможности "диалога" с объектом. Это подтверждается всей историей развития естественных наук. "Диалог" с клеткой в виде регистрации отклика на внешние факторы был начат с того времени, когда появилась возможность с помощью оптического микроскопа отождествлять элементы ее морфологии с функциями. Позже в клетках и микроорганизмах были также обнаружены зависимые от метаболизма флуктуации различных параметров (физи-

ческих и биохимических) с частотами от сотых долей до сотен герц [1]. Новые методы микроскопии [2] стимулировали более систематические исследования отклика отдельных клеток и органелл. Митохондрии оказались уникальным биологическим объектом, в котором функциональное состояние характеризуется доступным физическим измерением параметром [3]. В частности, использование встроенных в мембрану митохондрий флуоресцентных меток позволило регистрировать изменения во времени мембранного потенциала, связанные с вводом в среду инкубации различных субстратов [4, 5]. Результаты, приведенные в этих [4, 5] и других [6] работах, показали, что в "голосах" отдельных органелл может содержаться значительно больше информации, чем в "многоголосом хоре" их популяций. Поэтому новые физические методы проникновения в загадочный мир внутриклеточных явлений стали важным дополнением к традиционным для биологии методам, которые принято обозначать в литературе концепцией "структура–функция" [7]. В очень упрощенной форме основную цель этой концепции можно сформулировать как исследования связи между структурой и функцией. Обычно для описания структур используются преимущественно характеристики изображений клеток и органелл, а для функций — количественные параметры биохимических процессов, полученные усреднением на больших популяциях. При этом игнорируется нестационарный характер "событий" в клетках, кооперативность процессов, их пространственно-временная корреляция и т.п.

Традиционные физические методы оказались по ряду хорошо известных причин мало пригодными для описания процессов в биологических объектах. Одним из препятствий является отсутствие достаточно универсальных, физически детерминированных количественных параметров, описывающих состояние объекта, а также инвазивность существующих методов измерений.

**В.П. Тычинский.** Московский государственный институт радиотехники, электроники и автоматики (ТУ), 119454 Москва, просп. Вернадского 78, Российская Федерация  
Тел. (495) 434-67-92. Факс (495) 434-86-65  
E-mail: vtych@yandex.ru

Статья поступила 1 февраля 2007 г.

Кроме того, во многих случаях (исключение — митохондрии) был неизвестен механизм зависимости измеряемого физического параметра от функционального состояния объекта.

Для обозначения этих, весьма разнородных проблем предлагается дополнить концепцию "структура–функция" условным термином "сигнал" и в дальнейшем использовать для этой цели обозначение "сигнал–структура–функция" (ССФ). В этой концепции цель "диалога" формулируется как установление причинно-следственных связей между процессами в детерминированных морфологических структурах (органеллах), их биохимическими и физиологическими функциями, с одной стороны, и с другой — с адекватными "сигналами" в реальном времени, в которых идентифицировано содержание, достаточное для принятия решения в виде ответа. В качестве гипотетического примера такого ответа можно указать на уменьшение амплитуды флуктуаций рефрактерности при замедлении процессов синтеза пре-рибосом, вызванным снижением температуры клетки.

Кратко обозначим перечень вопросов, относящихся к проблеме ССФ. Требования к методу и измерительному прибору, наличие общедоступных тест-объектов, соглашения по унификации методик и т.п. заслуживают отдельного обсуждения. Для классификации и интерпретации сигналов, выделения в них универсальных значимых параметров предстоит большая работа, будет необходим "розеттский камень" для перевода сигналов различного происхождения на язык биофизики. Решение этих проблем — вызов для физиков и биофизиков. Цель данной статьи — привлечь внимание к междисциплинарной проблеме с условным названием "диалог" и показать на примерах принципиальную возможность ее решения.

В перечне проблем фундаментального характера, в которых можно ожидать прогресса при реализации проблемы "диалог", отметим:

— кооперативность процессов транскрипции и синтеза белков;

— взаимозависимость процессов экспрессии генов, транскрипции, синтеза и транспорта белков, их временных характеристик;

— исследования факторов, влияющих на процессы адаптации клеток к изменениям состава среды;

— интерактивную генную инженерию, контроль процессов транскрипции.

Решение этих и других подобных проблем возможно при условии использования различных методик, включая новые, обеспечивающие доступ к пространственно-временной информации на уровне отдельных органелл и клеток. Однако потенциал современной оптики, электроники и вычислительной техники еще далеко не в полной мере использован для создания методик, обеспечивающих практически неинвазивный доступ к внутриклеточной динамике.

Отметим ряд причин, по которым методология "диалога" с отдельной клеткой пока оказалась недостаточно эффективной.

1. Огромная сложность системы, изменения состояния во времени, отсутствие физических моделей, взаимозависимость процессов, неопределенное число параметров.

2. Отсутствие фундаментальных знаний о механизмах зависимости физических параметров объекта от

функционального состояния и происходящих в нем метаболических процессов.

3. Отсутствие неинвазивных методик и количественных данных о параметрах, характеризующих функциональное состояние объекта.

4. Ограниченная чувствительность, недостаточное пространственное и временное разрешение.

В этой работе предпринята попытка дать ответ на следующие вопросы:

— Какие физические параметры клетки, доступные измерениям в реальном времени, содержат информацию о функциональном состоянии? Какие условия необходимы для регистрации "сигналов"?

— Какие новые фундаментальные знания в биологии клетки можно ожидать от "диалога" с отдельной клеткой или микроорганизмом в реальном времени?

— Какова прогнозируемая ценность планируемых результатов для актуальных проблем биологии, экологии и медицины?

## 2. Обзор оптических методов исследований внутриклеточной динамики

Ограничимся здесь оптическими методами микроскопии, поскольку электронная микроскопия не позволяет исследовать процессы в живых клетках, а зондовые методы атомно-силовой микроскопии пока широко не используются. Выше отмечалось, что количественные данные о зависимости мембранного потенциала от функционального состояния митохондрий были получены методом флуоресцентной микроскопии [4–6]. Процедура встраивания флуоресцентной (например, TMRE) метки, калибровки мембранного потенциала (МП) и оценки артефактов обстоятельно обсуждалась в [4, 5]. По-видимому, в митохондриях флуктуации МП охватывали всю мембрану, но сведения о пространственно-временной корреляции флуктуаций не приводятся. К достоинствам метода следует отнести возможность спектрального анализа флуоресцентных сигналов. Основные недостатки методов флуоресцентной микроскопии неоднократно обсуждались в литературе. Сформулируем их в виде следующих тезисов.

1. Введение меток влияет на состояние объекта, необходим тщательный контроль концентраций красителей. При их диссоциации возникают активные формы кислорода.

2. Калибровка МП не привязана к физическим стандартам и производится в условных единицах, зависит от многих факторов — интенсивности и спектра источника, чувствительности и спектральной характеристики фотоприемника.

3. Интенсивность освещения и чувствительность используемой фотокамеры ограничивают время экспозиции и быстродействие единицами секунд.

4. Пространственное разрешение для исследований локальных динамических процессов недостаточно, несмотря на достижения флуоресцентной микроскопии, например, в виде регистрации субмикронных структур, малых кластеров в ядрышках и даже отдельных макромолекул.

Из новых методов, потенциал которых еще недостаточно реализован для целей внутриклеточной динамики, следует отметить CARS и различные варианты комбинационной нелинейной спектроскопии [8–10]. Важным

их достоинством является возможность регистрации колебательных частот макромолекул [9, 10], связанных с метаболическими изменениями структур.

По ряду причин (см. ниже) для исследования внутриклеточной динамики более перспективны интерференционные методы и их сравнительно новые модификации [11–23]. Фактором фундаментального значения для диагностики функционального состояния является связь измеряемой интерференционным методом оптической разности хода (ОРХ) с макроскопическим параметром среды — показателем преломления [11, 19, 20, 23]. Много фактов прямо или косвенно указывали на зависимость фазовой толщины (или ОРХ) от функционального состояния объекта [11, 13–17, 19, 20, 23–30]. Перспективность использования методов когерентной интерферометрии для исследования внутриклеточной динамики, по-видимому, впервые была показана в работе [11]. Не ставя здесь целью дать обстоятельный обзор большого числа появившихся позже публикаций, отметим только несколько новых работ. Измерения рефрактерности хлоропластов [24], цианобактерий [25], спор [25] и клеток [26–30] подтвердили основной вывод о диагностическом значении показателя преломления биообъектов различной природы. Парадоксальные, по мнению авторов [19], изменения рефрактерности при гипотоническом стрессе были обнаружены при измерениях нейронов методом голографической микроскопии. Авторы объясняют снижение рефрактерности при гипотонии уменьшением концентрации белков (а не изменением функционального состояния. — *В.Т.*). Методом гильберт-микроскопии [20] было показано снижение фазовой толщины при гемолизе эритроцитов. При гемолизе эритроцитов их объем снижался за 4 с на 50 %. На возможность использования рефрактометрии в проточных кюветах методом гильберт-микроскопии для диагностических целей указано в [23]. Эти выводы в целом согласуются с ранее опубликованными [24–26] результатами.

Эквивалентная модель биообъекта имеет принципиальное значение для применений интерференционных методов, для диагностики и интерпретации полученных результатов. Обычно оптически неоднородный реальный объект представляют однородной сферой с эквивалентным показателем преломления. В немногих случаях в фазовом изображении удается разделить структурные элементы и определить их рефрактерность. Вклад в ОРХ дают как геометрическая толщина, так и рефрактерность, поэтому их разделение и точность определения показателя преломления объекта имеют существенное значение для обнаружения малых изменений функционального состояния.

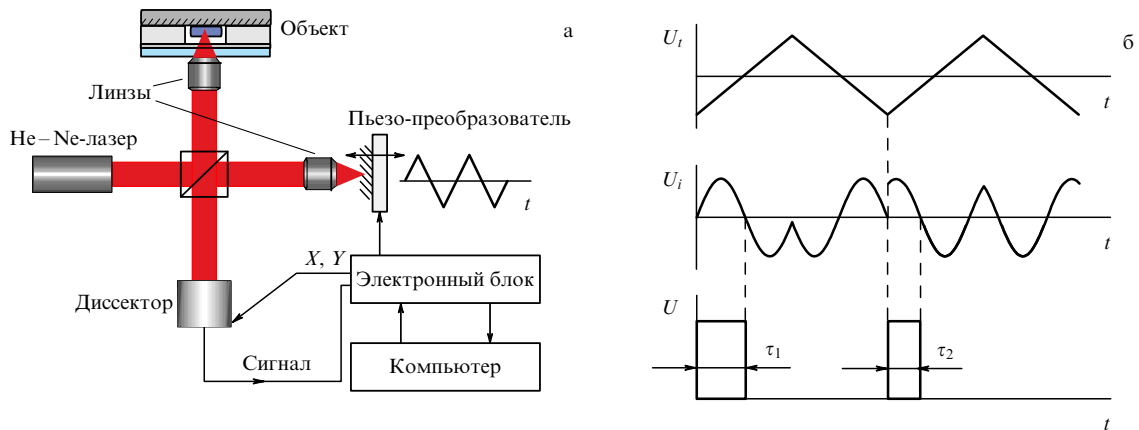
Для разделения вкладов в ОРХ физической толщины и показателя преломления объекта в работе [19] было предложено использовать две иммерсионные среды с известными показателями преломления. Но, по-видимому, более перспективно решение [23], основанное на использовании ячейки из материала с известным показателем преломления, что значительно упрощает измерения и увеличивает их точность. Метод гильберт-микроскопии с общим оптическим путем [23] обеспечил высокую точность результатов измерений, малую чувствительность к вибрациям и миллисекундное временное разрешение. Пространственное разрешение в этом методе было ограничено дифракцией на апертуре объектива.

Возможности метода когерентной фазовой микроскопии (КФМ) и его модификаций [11, 12, 23–30] обстоятельно рассмотрены в следующем разделе. Здесь же сформулируем основные выводы.

Использование интерференционных методов для исследований внутриклеточной динамики дает ряд существенных преимуществ перед другими оптическими методами. Они обеспечивают меньшую инвазивность (например, отсутствие флуоресцентных маркеров), более высокую чувствительность и быстродействие, а также представление локальной оптической разности хода (или фазовой толщины) в нормированных на длину волны значениях. Неокрашенные клетки представляют собой оптически неоднородные структуры, которые создают достаточно высокий контраст в интерференционных микроскопах. Их органеллы легко различаются по оптической плотности. Приведенные в [11–30] результаты подтверждают возможность получения новой информации, связанной с метаболическими процессами в клетке. Однако существенным ограничением применения традиционных, а также ряда новых [19–23] оптических методов является пространственное разрешение, ограниченное дифракцией на апертуре объектива. Размеры органелл, как правило, меньше или соизмеримы с длиной волны. Возможность значительного пространственного сверхразрешения в фазовых изображениях была впервые показана в [32–34].

### 3. Когерентный фазовый микроскоп "Эйрискан", метод динамической фазовой микроскопии

Описанные ниже и опубликованные в [11, 12, 24–34] результаты измерений получены на разработанном в МИРЭА когерентном фазовом микроскопе (КФМ) "Эйрискан" [11, 12], оптическая схема которого приведена на рис. 1. Микроскоп является модификацией микроинтерферометра Линника, в котором в качестве источника когерентного излучения использовался гелий-неоновый лазер. Для регистрации интерференционного сигнала и его аналого-цифрового преобразования в локальные значения фазы производилась линейно-периодическая модуляция фазы опорной волны, использовался координатно-чувствительный фотоприемник — диссектор и электронный блок. Принципиальное отличие от других интерференционных методов получения фазовых изображений, например в [13–23], состояло в том, что ОРХ измерялись последовательно в каждой точке изображения. Периодичность выборки и скорость ввода изображения определялись частотой модуляции 1 кГц (или 1 мс на пиксель). Частота модуляции ограничивала быстродействие метода, но полученные таким методом фазовые изображения имели ряд существенных достоинств. В частности, они отличались от изображений, регистрируемых традиционной [13–17], многошаговой [18] или гильберт-микроскопией [20–23], более высоким пространственным разрешением (до 100 нм) в статических фазовых изображениях [11, 12, 33, 34], до 25 нм в динамических [32] и произвольным доступом к точкам изображения. Рабочее поле микроскопа могло изменяться в пределах 5–50 мкм в зависимости от используемого объектива, максимальная размерность изображения по одной координате достигала 1024 пикселя. Ограниченная шумами чувствительность



**Рис. 1.** Когерентная фазовая микроскопия. (а) В оптической схеме когерентного фазового микроскопа "Эйрискан" используется источник когерентного излучения (лазер  $\lambda = 633$  нм) и линейно-периодическая модуляция фазы опорной волны. Фаза в каждом пикселе интерференционного изображения определялась при последовательном его сканировании координатно-чувствительным фотоприемником — диссектором ЛИ-620 ("Электрон", СПб) и электронным блоком. В поле зрения объектива обычно наблюдалась одна клетка или ее часть. (б) При модуляции фазы опорной волны  $U(t)$  происходит изменение интенсивности фототока  $I(t)$ . Локальное значение фазы определялось по длительности  $\tau$  импульса. Периодичность выборки и скорость ввода изображения определялась частотой модуляции 1 кГц (или 1 мс на пиксель). Ограниченная шумами чувствительность была около  $h_{\min} = 0,5$  нм.

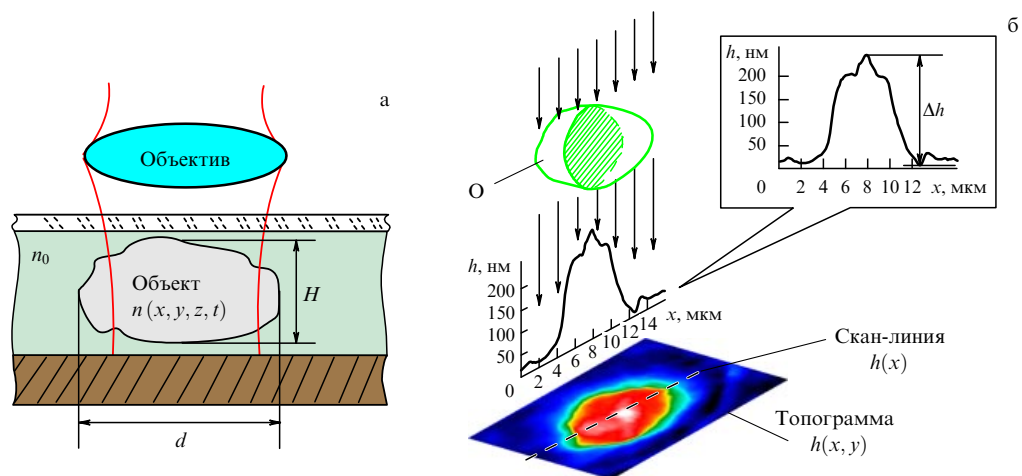
была около  $h_{\min} = 0,5$  нм. Здесь не обсуждается обнаруженное в фазовых изображениях [32–34] методом КФМ явление сверхразрешения, которое затрагивает фундаментальные проблемы оптики. Отметим только, что на функциональные изображения, в том числе на некоторые фазовые, не распространяется ограничение пространственного разрешения по критерию Рэлея.

Пакет программ КФМ позволял получать топограммы, 3D-фазовые изображения объектов и их фрагментов, производить редактирование файлов, инверсию, вычитание кадров, картирование флуктуаций и другие операции [24–31]. Программы динамической фазовой микроскопии (ДФМ) обеспечивали на произвольно установленной скан-линии периодические измерения ОРХ, их запись в виде матриц координата–время (трек-диаграмм) и представление динамических процессов как пространственно-временных "портретов".

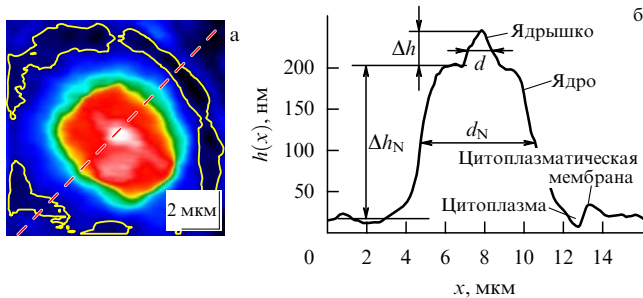
Интерпретация фазовых изображений основана на общепринятом представлении объекта в виде оптиче-

ской пространственно неоднородной среды с показателем преломления  $n(r, t)$  в ограниченной области пространства [11, 19]. Но выше отмечалось, что одна из основных проблем состоит в том, что измеряемая величина — ОРХ в приближении эйконала [11] или геометрической оптики для тонкой, прозрачной и пространственно неоднородной среды (например, клетки) зависит, в частности, от ее физической толщины и от рефрактерности — разности показателей преломления  $n(r, t)$  и внешней среды [11, 19–23].

На рисунке 2а показана модель клетки в виде локальной неоднородности с поперечными размерами  $d$  и  $H$ . Проходящая через клетку волна от когерентного источника испытывает искривление волнового фронта (пространственную модуляцию), которая в интерференционном микроскопе преобразуется в распределение ОРХ или фазовой толщины. Эта исходная информация в цифровом виде закодирована в топограмме (рис. 2б).



**Рис. 2.** Оптическая модель клетки. (а) Объект (клетка) представлен оптической неоднородностью  $n(x, y, z, t)$  в иммерсионной среде с показателем преломления  $n_0$ . (б) Волновой фронт падающей плоской волны модулируется объектом. Деформированный волновой фронт в интерференционном микроскопе преобразуется в топограмму — оцифрованное двумерное распределение оптической разности хода  $h(x, y)$  (фазовой толщины). Профиль фазовой толщины  $h(x)$  получают в сечении топограммы вдоль скан-линии.



**Рис. 3.** Фазовое изображение клетки культуры ткани НСТ 116. (а) В топограмме видно контрастное ядро и выделенная контурной линией менее контрастная граница цитоплазмы со средой. (б) В диаметральной сечении  $h(x)$  фазового изображения неокрашенной клетки видны более плотное ядро и ядрышко. В профиле фазовой толщины показаны размеры, по которым вычислялись рефрактерности ядра и ядрышка.

На рисунках 3а, б показаны топограмма и профиль фазовой толщины клетки культуры ткани человека НСТ 116 вдоль выбранной линии сечения. В топограмме (рис. 3а) псевдоцветом выделены области различной оптической плотности, видно контрастное ядро и подчеркнута контурной линией граница клетки. В типичном сечении фазового изображения неокрашенной клетки на рис. 3б хорошо различались по оптической плотности (или по фазовой толщине) ядро и ядрышко. Цитоплазма неокрашенной клетки в профиле фазовой толщины имела слабый, иногда даже отрицательный контраст. Необходимо напомнить, что в плоскость фазового изображения клетки на рис. 2б одновременно проецируются вклады элементов ее многослойной структуры и различных органелл. Поэтому, в частности, ширина области, прилегающей к границе клетки, оказалась значительно больше реальной толщины цитоплазматической мембраны. Топограмму и профиль фазовой толщины на рис. 3 можно рассматривать как некоторый обобщенный фазовый "портрет" клетки [11, 28–31].

Выше отмечалось, что с формальной точки зрения [11, 19] фазовое изображение в плоскости  $(X, Y)$  представляет собой двумерное распределение оптической разности хода

$$h(X, Y, t) \cong h(x, y, t) = \int [n(x, y, z, t) - n_0] dz,$$

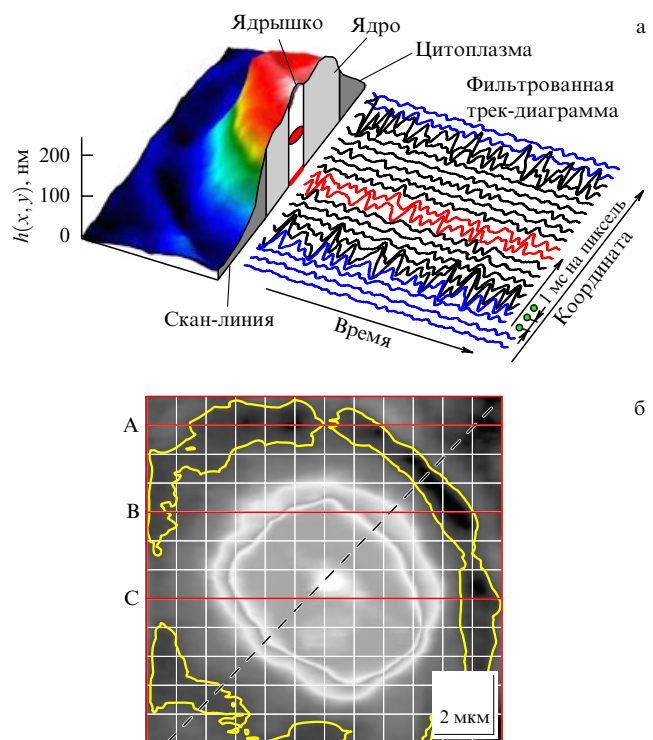
которое зависит в основном от разности показателей преломления объекта  $n(x, y, z, t)$  и внешней среды  $n_0$ . Оптическая разность хода  $h(X, Y)$  практически совпадает с функцией фазовой толщины в плоскости  $(x, y)$  объекта. Контраст органелл клетки в ее фазовых изображениях растет с их рефрактерностью  $\Delta n$ , которая равна средней разности показателей преломления объекта  $\langle n(x, y, z, t) \rangle$  и  $n_0$  иммерсионной среды. Однако это определение не может быть использовано в реальных условиях, если нет априорной информации о размерах неоднородности и объема, в котором получено среднее значение  $\langle n(x, y, z, t) \rangle$ . В том случае, когда усреднение предполагается по всему объему объекта, максимальная фазовая толщина  $\Delta h$  может быть представлена как

$$\Delta h = \Delta n H = [\langle n(x, y, z, t) \rangle - n_0] H.$$

Для интерпретации результатов интерференционных измерений в терминах рефрактерности как макроскопического параметра среды в МИРЭА использовали менее точный, но более удобный и легко реализуемый способ, основанный на предположении о форме объекта. И опыт показал, что во многих случаях приближение сферической или цилиндрической форм корректно, а измеряемый в фазовом изображении поперечный размер  $d$  может служить "эквивалентом" геометрической толщины  $H$ . Более обстоятельно этот вопрос обсуждается в [19, 22].

Здесь для определения рефрактерности использовано приближение  $H \cong d$  [11], для которого  $\Delta n = \Delta h/H \cong \Delta h/d$ , где  $\Delta h$  — максимальная фазовая толщина,  $d$  — поперечный размер в фазовых изображениях. Численные значения полученной в этом приближении рефрактерности митохондрий были применены для оценки вкладов в оптические компоненты электронной восприимчивости (см. ниже).

Одно из достоинств микроскопа "Эйрискан" — возможность регистрации в реальном времени динамических процессов. Медленные (порядка минут) изменения формы и фазовой толщины объекта обнаруживались в серии изображений, полученных с интервалом от 4 до 60 с (в зависимости от числа пикселей). Для регистрации сравнительно быстрых (0,001–1 с) флуктуаций в ограниченной области изображения использовался метод ДФМ [11]. Длина скан-линии (рис. 4а) и соответственно число пикселей на ней могло изменяться в пределах от



**Рис. 4.** Метод ДФМ. (а) В фазовом изображении (топограмме) клетки фиксировалась одна или ортогональная сетка скан-линий. Измерения профиля фазовой толщины вдоль скан-линии с фиксированным интервалом (от единиц до сотен миллисекунд) производились периодически в течение десятков секунд и записывались в виде матрицы  $h(x, t)$  (трек-диаграммы) в память компьютера. (б) В сечении трек-диаграммы наблюдались характерные флуктуации в окрестности ядерной мембраны и в области ядрышка.

2 до 1024. Значение максимальной частоты (Найквиста) в спектрах варьировалось в интервале 0,5–250 Гц. Минимальный размер пикселя для объектива Olympus 50\*/0,75 составлял 12 нм.

Для локализации участков метаболической активности клетки было разработано несколько методов. Интенсивные флуктуации наблюдались обычно на крутых участках профиля фазовой толщины. Поэтому выбор положения скан-линии на топограмме предусматривал пересечение предполагаемой области активности клетки (например, ядрышка, см. диагональ на рис. 4б). Измерения этим методом продолжались в течение десятков секунд. Более трудоемкими были измерения по линиям ортогональной сетки, фиксированным на изображении, например, с шагом 1 мкм (см. сетку на рис. 4б). В этом случае по каждой из них последовательно происходило сканирование в течение 15 с. Массивы данных в виде матрицы  $h(x, t)$  (см. фильтрованную трек-диаграмму на рис. 4а) для каждой скан-линии имели размерность  $32 \times 512$  пикселей (или  $12 \text{ мкм} \times 15 \text{ с}$ ). На измерение одного комплекта матриц (трек-диаграмм) из 20 сечений на одну клетку затрачивалось 10–15 мин. Этим методом можно было обнаружить в клетках "сигналы", которые проявлялись в медленных изменениях ОРХ, а также осуществлять "картирование" внутриклеточных "сигналов" и отождествлять их с конкретными биофизическими процессами. Характерные для функционального состояния органелл клетки сигналы можно было получить из продольных сечений трек-диаграмм (рис. 4а), а в поперечных ее сечениях можно было зафиксировать быстрые изменения профиля фазовой толщины как ответ на действие внешних факторов. В качестве количественной характеристики интенсивности флуктуаций  $I(x)$  использовалась дисперсия значений фазовой толщины  $h(x, t)$ . В целом, интерпретация флуктуаций фазовой толщины менее очевидна, поскольку их связь с элементами морфологии объекта не была известна.

#### 4. Результаты измерений морфологии органелл и клеток

Рефрактерность традиционно используется в микробиологии для определения функционального состояния спор [35]. В экспериментах МИРЭА использовали рефрактерность в качестве параметра, связанного с энергизацией митохондрий, и в [24] впервые сообщалось о ее зависимости от мембранного потенциала. Последующие исследования тилакоидов хлоропластов [25] показали зависимость рефрактерности от градиента концентрации протонов ( $\Delta pH$ ). Измерения цианобактерий *Synechocystis sp. PCC 6803* и спор *Bacillus licheniformis* также привели к выводу [26] о зависимости рефрактерности от энергизации, т.е. от метаболической активности в более широком смысле. Оказалось, что метаболическая компонента рефрактерности в биообъектах различной природы закономерно убывает при их деэнергизации [24–26, 28–31]. Для объяснения этого явления была предложена гипотеза, согласно которой изменение энергизации сопровождается изменением состояния части молекул воды. Эта простая модель (см. раздел 6 и Приложение) позволила получить формулу для нормированной метаболической ( $\chi_3/\chi_1$ ) компоненты восприимчивости среды, которая является, в известном смысле, количественной характеристикой энергизации или метаболической активности

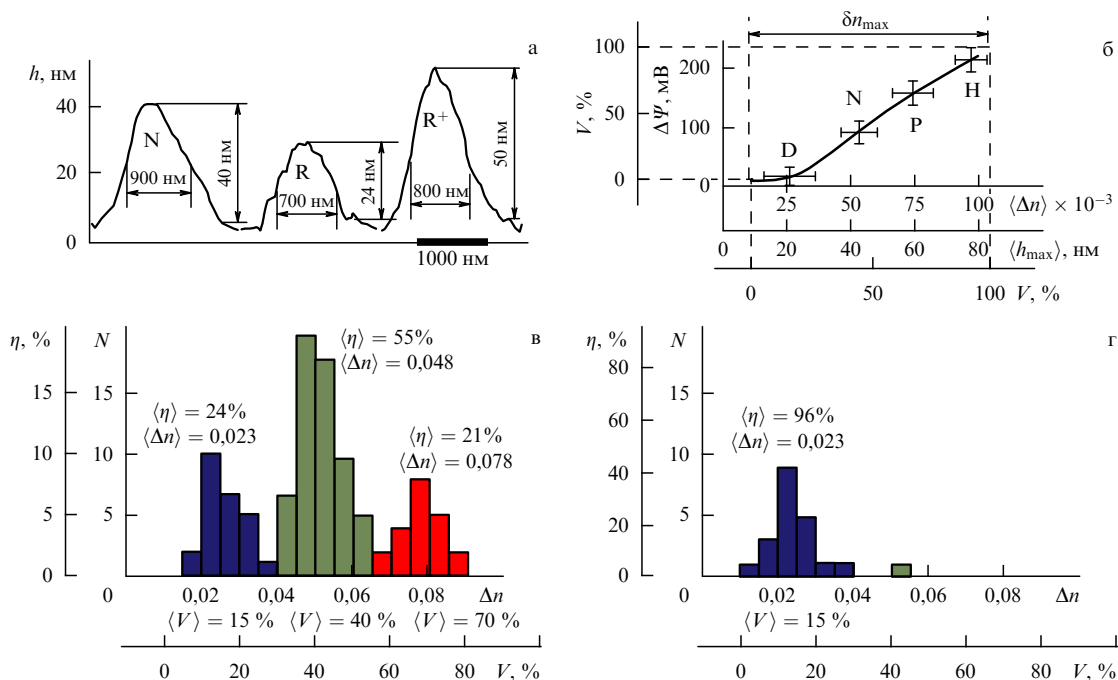
биообъекта. Нормировка метаболической компоненты рефрактерности позволила предложить более универсальную количественную характеристику — параметр "жизнеспособности" (см. ниже).

В измерениях величины  $\Delta h$  и  $d$  получались из профиля фазовой толщины биообъекта. При деэнергизации биообъектов в их фазовых изображениях происходили характерные изменения. Примером может служить изменение фазовой толщины митохондрии [24] при действии ротенона, который блокирует ферменты дыхательной цепи, и при введении АТФ, который увеличивал мембранный потенциал. На рисунке 5а показаны профили фазовой толщины для митохондрий в различных средах, а на рис. 5б приведена линейная зависимость средней рефрактерности  $\langle \Delta n \rangle$  от мембранного потенциала  $\Delta \Psi$ , полученная при измерении трех популяций митохондрий в средах различного состава [24]. Ротенон заметно снижал рефрактерность, и минимальные ее значения составляли  $\Delta n \approx 0,01$ . При АТФ-стимуляции наибольшие значения рефрактерности достигали  $\Delta n = 0,11–0,12$ . Превышение рефрактерности  $\delta n(\Delta \Psi) = \Delta n(\Delta \Psi) - \Delta n_{\min}$  над минимальным ее значением ( $\Delta n_{\min} = 0,01$ ) определялось как метаболическая компонента, а разность крайних значений  $\delta n_{\max} = 0,10$  принималась за интервал ее допустимых изменений. На дополнительной шкале слева приведены относительные значения мембранного потенциала ( $V, \%$ ), нормированного на максимальное значение  $\Delta \Psi_{\max} = 220 \text{ мВ}$ .

Результаты измерений митохондрии на рис. 5б были использованы для обобщения выводов на другие объекты, в которых мембранный потенциал недоступен для измерений или функциональное состояние которых неявно зависит от других параметров, например pH. Покажем, что при определенных предпосылках параметр  $V$ , условно обозначенный как "жизнеспособность" (viability), можно использовать для характеристики состояния отдельной клетки или органеллы. Действительно, линейная зависимость  $\delta n(\Delta \Psi) = \Delta n(\Delta \Psi) - \Delta n_{\min}$  приводит к выводу о возможности характеризовать состояние митохондрий как параметром  $V = \Delta \Psi / \Psi_{\max}$ , так и нормированной метаболической компонентой рефрактерности (превышением над минимальным ее значением  $\Delta n_{\min}$ ). Нормированную на максимальное значение ( $\delta n_{\max}$ ) метаболическую компоненту  $\delta n / \delta n_{\max}$  вследствие линейности зависимости  $\delta n(\Delta \Psi)$  можно интерпретировать как альтернативное определение относительной величины мембранного потенциала  $V = \Delta \Psi / \Psi_{\max} = \delta n / \delta n_{\max}$ . Примеры и целесообразность использования параметра "жизнеспособность" обсуждаются ниже (см. также раздел 6 и Приложение). На рисунке 5в приведены гистограммы для интактных и ингибированных митохондрий как в обычных координатах  $N(\Delta n)$ , так и в нормированных  $\eta(V)$ , где  $\eta = N/N_{\max}$  — доля митохондрий в интервале  $V, V + \Delta V$ . В гистограмме рис. 5в видны три субпопуляции со средними значениями рефрактерности  $\langle \Delta n \rangle = 0,023; 0,048$  и  $0,078$ ,  $\langle V \rangle = 15; 40$  и  $70 \%$  и "весами"  $\langle \eta \rangle = 24; 55$  и  $21 \%$ . Из сравнения гистограмм на рис. 5в, г видно, что при введении ротенона увеличилась доля ( $\langle \eta \rangle = 24 \%$  до  $\langle \eta \rangle = 96 \%$ ) малоэнергичных митохондрий.

Общность обнаруженного явления — зависимости рефрактерности и "жизнеспособности" от функционального состояния подтверждается измерениями на объектах совершенно другой природы. На рисунках 6а, в





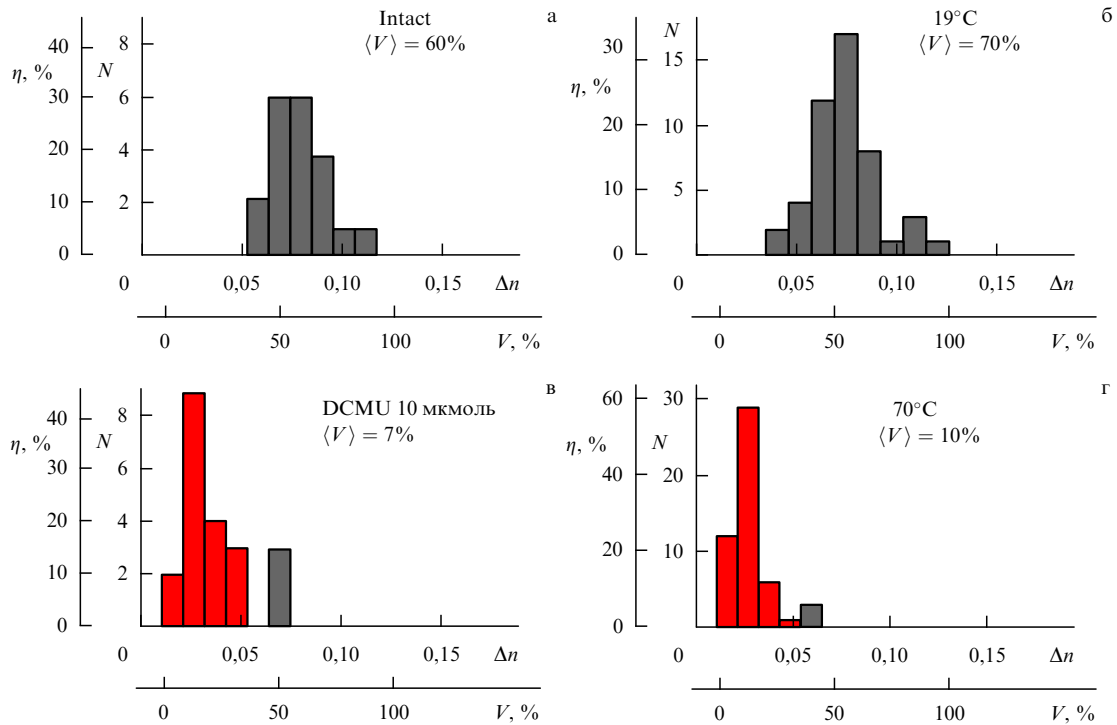
**Рис. 5.** Действие ротенона и АТФ на рефрактерность митохондрий. (а) Профили фазовой толщины для интактной (N), ингибированной ротеноном (R) и стимулированной АТФ (R<sup>+</sup>) митохондрий. (б) Состав среды инкубации влиял на мембранный потенциал ( $\Delta\Psi$ ) и на рефрактерность ( $\langle\Delta n\rangle = \Delta h/d$ ) митохондрий. Линейная зависимость ( $\langle\Delta n\rangle = \Delta n_{min} + K\Delta\Psi$ ) объяснялась [33] электрооптическим эффектом. Разность  $\delta n_{max} = \Delta n_{max} - \Delta n_{min}$  определена как максимальное значение метаболической компоненты рефрактерности. Использование нормировки на максимальное значение мембранного потенциала или на  $\delta n_{max}$  позволило ввести для характеристики состояния клетки безразмерный параметр "жизнеспособности"  $V = \Delta\Psi/\Delta\Psi_{max} = \Delta n/\delta n_{max}$  (см. текст). (в) В гистограмме интактных митохондрий видны три субпопуляции с различными средними значениями рефрактерности ( $\langle\Delta n\rangle = 0,023; 0,048$  и  $0,078$ ). Нормировка на полученную из гистограмм величину  $\delta n_{max} = 0,12$  позволила для каждой группы определить значения параметра "жизнеспособности". Вторая шкала соответствует перенормировке гистограмм для представления результатов в значениях  $V, \%$ . По ординате наряду с абсолютными значениями чисел реализации  $N$  приведены также их нормированные на  $N_{max}$  значения  $\eta = N/N_{max}$  (см. Приложение). (г) В гистограмме ингибированных ротеноном митохондрий остался только один максимум ( $\langle\Delta n\rangle = 0,023$  ( $V = 15\%$ )) с  $\langle\eta\rangle = 96\%$ .

приведены результаты измерений цианобактерии *Anabaena*, из которых видно снижение средней рефрактерности  $\langle\Delta n\rangle$  и "жизнеспособности" (энергизации)  $\langle V\rangle$  при блокировании электронного транспорта DCMU и при температурном шоке (нагреве до 70 °C) в течение 5 мин. Различие средних значений рефрактерности  $\langle\Delta n\rangle_{max}$  интактных цианобактерий и  $\langle\Delta n\rangle_{min}$  дезэнергизованных видно из гистограмм на рис. 6а, б. Влияние ингибиторов на значения нормированной рефрактерности можно характеризовать как снижение средней "жизнеспособности" цианобактерий от  $\langle V\rangle = 60-70\%$  до  $\langle V\rangle = 7-10\%$  от максимального значения. Удивительно, что в обоих случаях наблюдалось почти одинаковое изменение рефрактерности. Возможное объяснение состоит в том, что в обоих случаях происходила почти полная дезэнергизация бактерий. Аналогичным способом производились измерения и определялись средние значения  $\langle\Delta n\rangle_{max}$  и  $\langle\Delta n\rangle_{min}$  для цианобактерий *Synechocystis*, хлоропластов бобов, спор, дрожжей. В каждой выборке было от 20 до 50 измерений. Результаты обработки представлены в таблице, где приведены также данные для нейрона из [19] и для ядрышек и ядер клеток НСТ 116 [28–31].

Из данных таблицы следует нетривиальный факт снижения рефрактерности биообъектов различной природы при их дезэнергизации различными средствами, а также удивительная близость их минимальных ( $\langle\Delta n\rangle_{min} = 0,01-0,025$ ) значений. Малые значения рефрактерности при дезэнергизации и, соответственно, близость их

показателя преломления  $n_0 = 1,33$  для воды свидетельствуют о сравнительно малом вкладе "сухого" вещества и преобладающем вкладе воды (см. Приложение). Этот результат вполне согласуется с высоким процентным содержанием воды в биообъектах. Но изменение максимальных значений рефрактерности в значительно более широких пределах ( $\langle\Delta n\rangle_{max} \cong 0,03-0,1$ ) в интактных биообъектах необычно и заслуживает отдельной дискуссии. Это может быть как отображением их индивидуальных свойств, предьстории, так и общей для данного вида характеристикой, зависящей от специфической структуры объекта. По-видимому, "норма" ( $\delta n_{max} = \langle\Delta n\rangle_{max} - \langle\Delta n\rangle_{min}$ ) является характеристикой конкретной группы объектов. Важный результат представляет также вывод (см. Приложение), что соответствующая метаболическая компонента восприимчивости во многих случаях была значительно больше "сухой" ( $\chi_3 > \chi_2$ ) и зависела от функционального состояния биообъекта.

Дополним приведенные в таблице значения следующими комментариями. В митохондриях клеток печени в гипотоническом растворе при действии цианида и ротенона, блокирующего первый комплекс дыхательной цепи, среднее по ансамблю значение рефрактерности снижалось от  $\langle\Delta n\rangle_{max} = 0,05-0,08$  до  $0,01-0,02$ . При введении сукцината и при АТФ-стимуляции наблюдались максимальные (до  $\langle\Delta n\rangle = 0,12$ ) значения рефрактерности [24]. На изолированных хлоропластах увеличение рефрактерности происходило [25] как ответ на



**Рис. 6.** Действие ингибиторов на рефрактерность и "жизнеспособность" цианобактерии *Anabaena*. (а, в) Гистограммы распределения интактных и ингибированных DCMU бактерий показывают снижение средней "жизнеспособности" с 60 до 7%. (б, г) Гистограммы бактерий в норме (19 °С) и после температурного шока (70 °С) показали снижение средней "жизнеспособности" с 70 до 10%.

**Таблица.** Влияние среды на рефрактерность биообъектов

Объект	Фактор дезэнергизации	$\langle \Delta n \rangle_{\min}$	$\langle \Delta n \rangle_{\max}$	Энергизация	Литература
Митохондрия	KCN, ротенон	0,02	0,08–0,1	АТР, сукцинат	[33]
Хлоропласт	DCMU, нигерицин	0,02	0,05	Интактные	[31]
<i>Synechocystis PCC 6803</i>	KCN	0,025	0,07	Интактные	[32]
<i>Anabaena variabilis</i>	DCMU	0,02	0,05	Интактные	—
Споры бактерий <i>Bacillus licheniformis</i>	$T = 120^\circ\text{C}$	0,025	0,075	Покой	[12]
Дрожжи	KCN	0,023	0,07	Интактные	—
Ядрышки НСТ 116	Актиномицин	0,01	0,05	Интактные	[12–14]
Ядра НСТ 116	Ротенон, SF6847	0,015	0,03	Интактные	[34]
Нейрон	Гипотония	0,032	0,042	Интактные	[7]

*Примечание.* Из таблицы следует факт снижения рефрактерности биообъектов различной природы при их дезэнергизации различными средствами, а также близость их минимальных ( $\langle \Delta n \rangle_{\min} = 0,01–0,025$ ) значений. Разность  $\delta n = \langle \Delta n \rangle_{\max} - \langle \Delta n \rangle_{\min}$  является признаком метаболической компоненты рефрактерности.

освещение после короткой (1–5 мин) темновой паузы. В результате действия ингибиторов фотосинтеза (нигерицина) и электронного транспорта (DCMU) их рефрактерность снижалась от  $\langle \Delta n \rangle_{\max} = 0,04–0,05$  до  $\langle \Delta n \rangle_{\min} = 0,02–0,025$ . В цианобактериях *Synechocystis PCC6803* [26] введение DCMU приводило к снижению рефрактерности  $\langle \Delta n \rangle_{\min}$  от 0,075 до 0,025. В покоящихся спорах бактерий *Bacillus licheniformis* рефрактерность была максимальной ( $\langle \Delta n \rangle_{\max} = 0,05–0,08$ ). После автоклавирования ( $T = 120^\circ\text{C}$  в течение 20 мин) их рефрактерность снижалась до  $\langle \Delta n \rangle = 0,01–0,02$ . Менее систематические измерения на клетках дрожжей *Saccharomyces cere-*

*visiae* показали в норме  $\langle \Delta n \rangle_{\max} \cong 0,065–0,075$ . При блокаде ферментов дыхательной цепи азидом максимум переместился на  $\langle \Delta n \rangle \cong 0,025$ . Средний диаметр клеток почти не изменялся и был около 4 мкм.

В таблицу включены также предварительные результаты измерений клеток человека НСТ 116 (см. ниже), из которых следует принципиальная возможность использования рефрактерности ядрышка для характеристики функционального состояния клетки.

Для количественной оценки вкладов в рефрактерность приведенных в таблице объектов была использована абстрактная модель биообъекта, в которой основ-



ными компонентами среды биообъекта предполагались вода (индекс 1), "сухой" остаток (2) и метаболическая компонента (3), природа которой обсуждается ниже. Оценки показали (см. Приложение), что, например, для митохондрий в деэнергизованном состоянии вклад нормированной к воде "сухой" компоненты ( $\chi_2/\chi_1 \cong 7\%$ ) в восприимчивость среды значительно меньше нормированного вклада метаболической компоненты ( $\chi_3/\chi_1 \cong 18\%$ ). Этот парадоксальный результат для митохондрий и аналогичные оценки для других биообъектов удивительны. Действительно, невозможно предложить разумное объяснение "исчезновению" материальной компоненты в деэнергизованных митохондриях, эквивалентному снижению доли "сухой" массы ее среды с 25 до 7%. Более естественным и правдоподобным объяснением этого парадокса представляется гипотеза об изменении состояния (например, восприимчивости и оптических свойств) какого-то компонента среды, характерного для всех исследованных биообъектов. Естественно, что таким общим для живой материи компонентом является вода. Механизм ее вклада в метаболическую компоненту рефрактерности представляет собой проблему фундаментального характера (см. раздел 6).

## 5. Регистрация метаболических сигналов в клетках

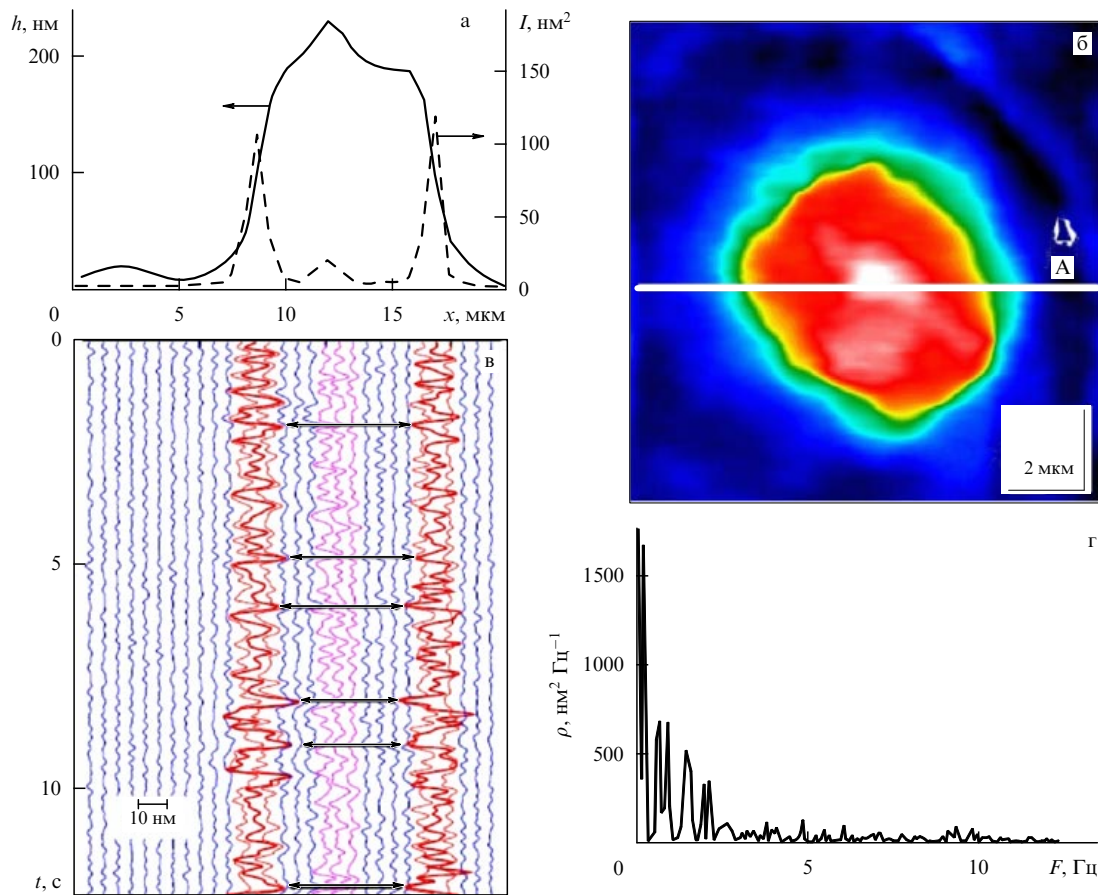
Измерения профилей фазовой толщины  $h(x)$  и интенсивности флуктуаций  $I(x)$  в различных сечениях ортогональной сетки позволили локализовать участки высокой метаболической активности. Границу клетки и среды на фазовом изображении и в профиле фазовой толщины в диаметральном сечении клетки можно было распознать по слабому (3–5 нм) увеличению фазовой толщины на участке протяженностью  $\sim 1$  мкм в окрестности изображения границы цитоплазматической мембраны. В топограмме на рис. 3а, которая является проекцией многослойной структуры клетки, эта область обозначена контурной линией. Участок протяженностью 1–2 мкм, на котором отмечалось локальное снижение фазовой толщины на 15–20 нм между границей клетки и характерными крутыми склонами в профиле ядра, соответствует проекции цитоплазмы. Из отрицательного контраста следует вывод, что рефрактерность цитоплазмы была слабо негативной ( $-\Delta n \cong 0,002 - 0,004$ ). В касательном к границе клетки сечении (вдоль линии А на рис. 4б) наблюдался локальный рост фазовой толщины, что вполне естественно объяснить увеличением оптического пути в области более плотной плазматической мембраны. На этом участке также зафиксировано незначительное локальное увеличение интенсивности флуктуаций (данные не приводятся).

Существенно другой профиль фазовой толщины  $h(x)$ , в котором хорошо различалось ядро, и более интенсивные флуктуации  $I(x)$  в виде увеличенной дисперсии изменений фазовой толщины наблюдались в диаметральном сечении клетки (рис. 7а) (см. также горизонтальную скан-линию С на рис. 4б). В профиле  $h(x)$  на фоне сравнительно плоской вершины ядра было хорошо видно локальное увеличение (до 60 нм на участке 1–1,5 мкм) фазовой толщины, которое отождествлялось с ядрышком. Ядрышко было также хорошо различимо в топограмме, в 3D-изображениях клетки и подтверждались данными электронной микроскопии (данные не при-

водятся). Крутизна профиля фазовой толщины на склонах ядра достигала значения 0,2 при его фазовой толщине  $\Delta h \cong 160 - 200$  нм и диаметре  $d \cong 8 - 10$  мкм. Напомним, что фазовая толщина оказалась в десятки раз меньше реальной (геометрической). По величинам  $\Delta h$  и  $d$  можно было получить численную оценку рефрактерности ядра ( $\Delta n_N = 0,02$ ). Соответственно рефрактерность ядрышка ( $\Delta n = 0,06$ ) оказалась значительно больше. Этот результат согласуется с опубликованными данными о более высокой концентрации белков в ядрышке.

Флуктуации фазовой толщины могут быть вызваны рядом причин, в том числе техническими. Но локальный рост интенсивности флуктуаций (до  $I(x) \cong 30 \text{ нм}^2$ ) в окрестности ядрышка рассматривался как признак его метаболической активности, которая обстоятельно обсуждается ниже. Здесь же обратим внимание на нетривиальный результат — локальный рост интенсивности флуктуаций до  $150 \text{ нм}^2$  на границе ядра вблизи ядерной оболочки. Характер сигналов и их большая (до 20 нм) амплитуда видны из трек-диаграммы на рис. 7в. Радиальная ширина активной области была около 1 мкм, что на порядок превышает известную из электронной микроскопии толщину ядерной оболочки. Сигналы на противоположных склонах ядра были частично антикоррелированы (см. линии с двойной стрелкой). Антикореляция во флуктуациях фазовой толщины ядерной оболочки могла быть следствием как изменений диаметра, так и движений ядра. Из рисунка 7в видно, что флуктуации фазовой толщины ядрышка (средние треки) отличались по амплитуде и форме и не коррелировали с флуктуациями ядерной оболочки. Характер сигналов на трек-диаграммах и интенсивные спектральные компоненты в ограниченном интервале частот 0,3–2 Гц на рис. 7г являются признаками их неслучайной природы. Этот вывод был подтвержден ингибиторным анализом. Например, добавление 0,25 мкмоль актиномина Д, который блокирует транскрипцию рДНК, через 25 мин вызывало снижение интенсивности флуктуаций на порядок (до 6–8  $\text{нм}^2$ ) и исчезновение контрастных компонент в спектре (данные не приводятся).

Измерения на малом участке в касательном к границе ядра сечении (см. скан-линии В на рис. 4б) с объективом Olympus 50\*/0,75 и, соответственно, при более высоком разрешении показали наличие мелко-масштабных структур. Структура с характерными поперечными размерами 50–100 нм показана в профиле фазовой толщины  $h(x)$  на рис. 8а. Локальное (70–100 нм) увеличение интенсивности флуктуаций  $I(x)$  на другом участке скан-линии в окрестности точек  $x = 0,5$  и 1 мкм видно из рис. 8б. Из спектрального портрета на рис. 8в следовало, что в окрестности точки  $x = 1$  мкм контрастные спектральные компоненты с частотами  $F = 0,15; 0,5; 0,8; 1,2; 1,8$  и 2,3 Гц имели очень малую (70–100 нм) протяженность вдоль скан-линии. Спектральная плотность отдельных компонент достигала  $2000 \text{ нм}^2 \text{ Гц}^{-1}$  (рис. 8г) и превосходила показанные на рис. 7г значения для диаметального сечения. Из этого следует вывод, что флуктуации в диаметральном и тангенциальном сечениях были вызваны различными причинами. Нестационарный характер процессов, их пространственная корреляция и характерная форма сигналов с амплитудой, достигающей 20 нм, видны из трек-диаграммы на рис. 8д. Протяженность вдоль скан-

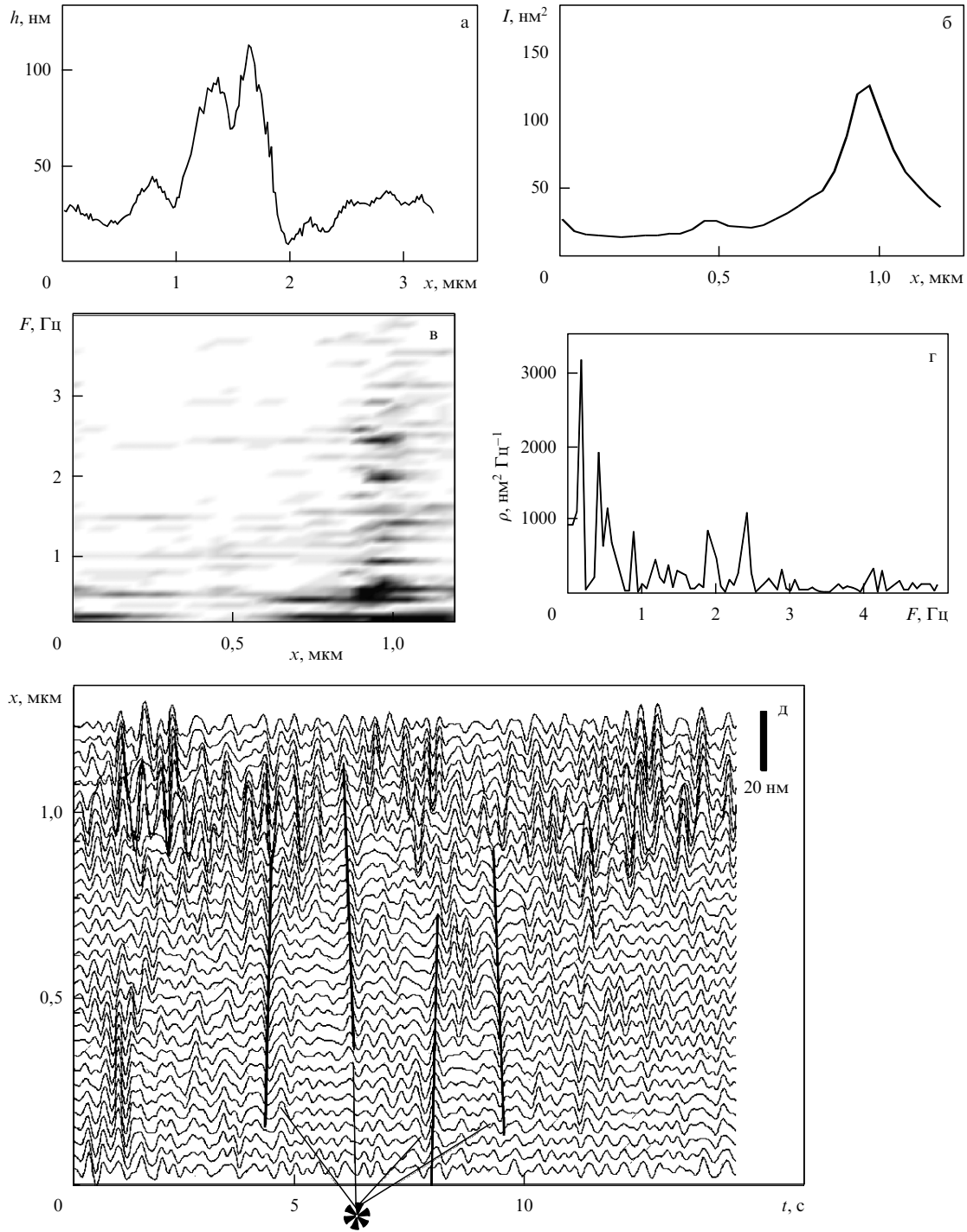


**Рис. 7.** Профиль фазовой толщины и флуктуации в диаметральном сечении клетки. (а) В профиле фазовой толщины  $h(x)$ , полученном в сечении вдоль скан-линии А видно ядрышко как локальное увеличение толщины на фоне ядра. Интенсивные флуктуации  $I(x)$  регулярно наблюдались на границах ядра и в области ядрышка. Ингибиторный анализ подтвердил метаболический характер флуктуаций. Радиальная ширина этой активной области на порядок превышает известную из электронной микроскопии толщину ядерной оболочки. (б) В топограмме клетки видна корреляция изображений ядра и ядрышка с профилем фазовой толщины. (в) В трек-диаграмме большие (до 20 нм) амплитуды флуктуаций с повторяющимися характерными структурами наблюдались в окрестности ядерной оболочки. Несколько меньшие амплитуды наблюдались в области ядрышка. Точки заметной антикорреляции на противоположных границах ядра отмечены двойной стрелкой. (г) В спектрах флуктуаций на границах ядра наблюдались интенсивные контрастные компоненты в интервале частот 0,3–2 Гц.

линии некоторых, отмеченных звездочкой сигналов достигала больших (до 1 мкм) значений и заметно превосходила ширину активного участка на рис. 8б, в. Проходящие через их характерные точки линии имели заметный наклон ( $\approx \pm 1$  мкм  $\text{с}^{-1}$ ), которому пока нет объяснения. Локальные флуктуации в окрестности предполагаемых пор могут быть объяснены транспортом белков и пре-рибосом (см. раздел 7).

Кратко остановимся на возможном механизме этих сигналов. Хорошо известно, что ядрышко является высоко организованной органеллой с большим числом более мелких связанных друг с другом фибриллярных центров с различной степенью конденсации рДНК и менее плотного гранулярного компонента [36–42]. Изображение ядрышка в профиле фазовой толщины на рис. 7а и трек-диаграмма его флуктуаций на рис. 7в, полученные при измерениях с малым увеличением (с объективом Olympus 20\*/0,4), не передают деталей его структуры и динамики. Более мелкие детали структуры ядрышка и ее временные изменения стали заметны при измерениях с большим увеличением (с объективом Olympus 50\*/0,75). Динамика ядрышка проявлялась, в частности, в изменении его размеров, формы и фазовой толщины в течение немногих минут. На некоторых ядрышках были также

хорошо заметны внутренние изменения структуры. В сечении ядрышка на рис. 9а видно локальное увеличение фазовой толщины на 15 нм в области с поперечным размером около 300 нм. Коррелированные в пространстве-времени флуктуации с характерными повторяющимися структурами ("событиями") наблюдались в сечении, проходящем через это утолщение, и показаны на фрагменте трек-диаграммы на рис. 9б. Интенсивность флуктуаций (см.  $I(x)$  на рис. 9в) резко изменялась в поперечном сечении и достигала максимума 35  $\text{нм}^2$  на границе с утолщением, которое, предположительно, соответствовало проекции плотного фибриллярного компонента. В окрестности максимума интенсивности на участке с поперечным размером около 300 нм происходили локальные процессы, которым в спектральном портрете на рис. 9г соответствовали как протяженные низкочастотные (0,2–0,7 Гц) компоненты, так и короткие (до 50 нм) с частотами в интервале 0,7–1,5 Гц. Протяженность "событий" вдоль скан-линии на трек-диаграмме (рис. 9д) изменялась в широких (50–400 нм) пределах. Метаболическая природа "событий" была подтверждена ингибиторным анализом. Введение малых ( $< 0,1$  мкмоль) доз актиномина Д вызывало заметные изменения в морфологии и сигналах [28–31].

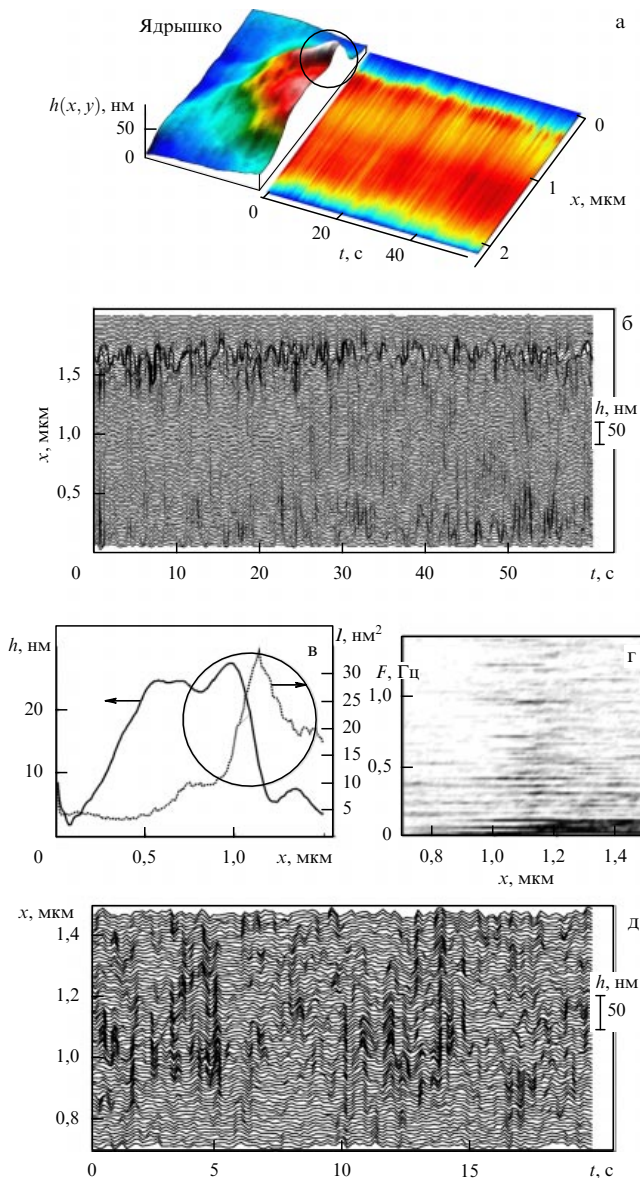


**Рис. 8.** Флуктуации в касательном к границе ядра сечении. (а) Структуры с размерами до 100 нм, близкими к размерам ядерной поры, наблюдались в сечении вдоль скан-линии В на рис. 4б. (б) На участках скан-линии в окрестности точек  $x = 0,5$  и  $1$  мкм наблюдался локальный ( $\sim 100$  нм<sup>2</sup>) рост интенсивности флуктуаций фазовой толщины. (в) В окрестности предполагаемой поры ( $x = 1$  мкм) на фрагменте спектрального портрета видны контрастные компоненты в интервале частот  $F = 0,15 - 2,5$  Гц с малой (70–100 нм) протяженностью вдоль скан-линии. (г) Контрастные компоненты с высокой спектральной плотностью хорошо видны в вертикальном сечении спектрального портрета в точке  $x = 1$  мкм. (д) Неслучайная форма сигналов с характерными повторяющимися структурами различной протяженности вдоль скан-линии в окрестности предполагаемой поры может быть связана с изменениями фазовой толщины при транспорте белков и пре-рибосом. Отмеченные звездочкой линии свидетельствуют о процессах с большим радиусом корреляции.

Флуктуации прекращались в течение нескольких минут и восстанавливались через 30–40 мин. При больших дозах (0,6–1,0 мкмоль) изменения профиля и флуктуаций были необратимы (данные не приводятся). Эти результаты позволяют утверждать, что флуктуации оптической разности хода в ядрышке связаны прямо или косвенно с

процессами транскрипции рДНК и синтезом пре-рибосом [36–42].

Для интерпретации результатов измерений были использованы приведенные в литературе [36–39] модели и численные оценки скорости синтеза [38–41]. Согласно современным представлениям [39–41, 43–45] в каж-



**Рис. 9.** Флуктуации в окрестности ядрышка. (а) Детали пространственной структуры были видны в ядрышке на поле  $2 \times 2$  мкм<sup>2</sup> при большом увеличении (объектив Olympus 50\*/0,75). Локальному увеличению фазовой толщины с поперечным размером около 300 нм (внутри окружности) предположительно соответствует плотный фибриллярный компонент, на границе которого с гранулярным компонентом происходит синтез пре-рибосом. Положение скан-линии было выбрано для регистрации флуктуаций, связанных с предполагаемыми процессами транскрипции и синтеза. (б) На трек-диаграмме видна пространственно-временная корреляция и локальность флуктуаций с повторяющимися структурами ("событиями") различной протяженности вдоль скан-линии. (в) Видно положение активной области, где интенсивность флуктуаций  $I(x)$  достигала  $35 \text{ нм}^2$ , относительно крутого склона на профиле  $h(x)$  фазовой толщины. В остальной части ядрышка (предположительно — в гранулярном компоненте) интенсивность была в 3–4 раза ниже. (г) Из фрагмента спектрального портрета видно преобладание в активной области протяженных низкочастотных ( $F = 0,2–0,7$  Гц) компонент и малая (до 50 нм) протяженность вдоль скан-линии более высокочастотных ( $F = 0,7–1,7$  Гц). (д) В трек-диаграмме активной области видны "сигналы" характерной структуры, связанные, по-видимому, с синтезом пре-рибосом.

менно происходит синтез многих тысяч пре-рибосом. На каждой транскрипционной единице свыше сотни рРНК-полимераз (Pol I) последовательно во времени инициируют и завершают синтез гигантских молекул-предшественников 45S с массой  $4,6 \times 10^6$  Да. Синтез одной 45S частицы продолжается от 150 до 300 с, затем она с временным интервалом около 1–2 с отделяется от транскрипционной единицы и перемещается в область гранулярного компонента. В течение каждого периода продолжительностью  $T \cong 1–2$  с происходят следующие процессы [36–45]: самосборка и инициация Pol I, элонгация пре-рибосом путем присоединения всеми Pol I аминокислот, диссоциация Pol I, терминация синтеза и отделение очередной пре-рибосомы. Необходимость синхронного движения всего ансамбля из большого числа Pol I, по крайней мере, в пределах каждой транскрипционной единицы очевидна, несмотря на отсутствие прямых доказательств. Не останавливаясь на многих важных деталях синтеза пре-рибосом, например, коррелированного во времени выхода пре-рибосом в область гранулярного компонента, отметим, что согласно приведенным в [39–41, 43–45] оценкам средний период инициации на транскрипте близок к значению  $T \cong 1,4$  с, что соответствует частоте 0,7 Гц. Из спектрального портрета на рис. 9г следует, что частоты флуктуаций на активном участке ядрышка (в кластере) близки к этому значению и находятся в интервале 0,2–1 Гц. Совпадение значений едва ли случайно, и этот результат согласуется с предложенным ниже сценарием.

В каждом из кластеров в активной области ядрышка одновременно работает около десятка "конвейеров" и в них синхронно движутся ансамбли Pol I. Присутствие в ядрышке интенсивных сигналов неслучайного характера и контрастных компонент с частотой до 1 Гц согласуется с синхронным движением Pol I и свидетельствует, по крайней мере, о взаимном влиянии и частичной синхронизации процессов между "конвейерами". По-видимому, связанные с этими кооперативными процессами макроскопические изменения фазовой толщины являются наиболее вероятной причиной наблюдаемых в ядрышке флуктуаций.

В предлагаемом сценарии мелкомасштабные (50–70 нм) "события" в пределах активной области на трек-диаграмме (рис. 9б) и в спектральном портрете на рис. 9г можно отнести к работе отдельных транскрипционных единиц. Немногие "события" большей протяженности можно объяснить движениями всего кластера и/или кооперативными движениями находящихся в нем нескольких транскрипционных единиц [42, 43]. Положение кластера, отождествляемого с центром "событий", могло изменяться в пределах активной области.

Констатация ритмичности процессов также дает достаточно оснований для физической интерпретации на качественном уровне происхождения "сигналов". Например, они могут быть следствием конформационных переходов в Pol I, вызывающих регулярные изменения оптической плотности в макроскопических объемах кластера. Заметим, что для изменений фазовой толщины порядка 20 нм на кластере с размером около 200 нм достаточно локального изменения рефрактерности на 0,1. Конечно, процессы транскрипции и синтеза весьма сложны и пока не видно способов разделить их вклады в "события", связанные с ритмичной работой "конвейеров". Тем не менее воспроизводимые структуры сигнала

дом из кластеров с объемом около  $0,01 \text{ мкм}^3$  приблизительно на десятке транскрипционных единиц одновре-



лов и другие признаки универсальности "событий" указывают на их связь с фундаментальными процессами. Обсуждение конкретных механизмов зависимости оптических параметров от функционального состояния клеток и органелл выходит за рамки этой работы.

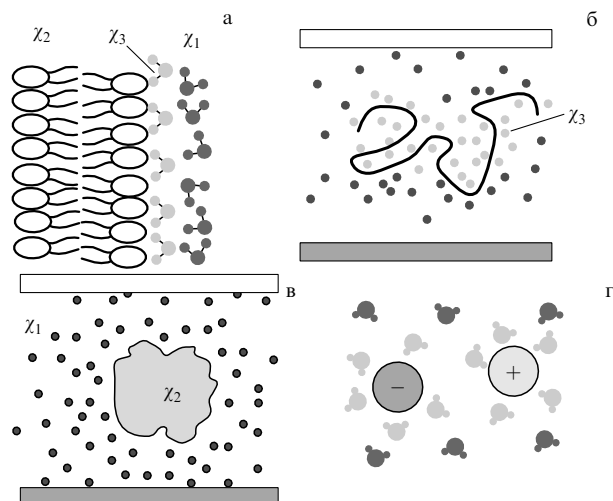
## 6. Механизмы метаболической зависимости рефрактерности

Ясность в фундаментальном вопросе биофизики — зависимости рефрактерности от метаболизма необходима для успешного применения предлагаемых методов. По-видимому, можно предложить, по крайней мере, несколько гипотез для объяснения этих достаточно универсальных механизмов. Но пока известно сравнительно немного фактов, свидетельствующих о зависимости рефрактерности от метаболизма [19–31], и еще меньше известно о природе этой зависимости. Есть основания предложить три модели, которые можно условно определить как гидратную, конформационную и структурную. Для обоснования наиболее вероятной гидратной гипотезы о происхождении механизма метаболической компоненты рефрактерности, напомним следующие факты.

1. Прекращение метаболических процессов сопровождается падением электрохимического потенциала  $\Delta\mu = \Delta\psi + \Delta\mu_{\text{рН}}$  и/или изменением зарядового состояния белков, например, при переходе спираль–клубок хроматина в конденсированное состояние в растворах большой ионной силы.

2. Показатель преломления в растворах электролитов растет с увеличением концентрации ионов. Это объясняется появлением в гидратной оболочке ионов молекул воды с более упорядоченной ориентацией дипольных моментов (см., например, [46]).

Предлагаемая гипотеза основана на констатации факта, что прекращение метаболизма сопровождается снижением концентрации ионов в биообъекте и плотности зарядов на его цитоплазматических мембранах. Этот механизм наиболее характерен для биообъектов с развитой мембранной системой и проявляется в цианобактериях, митохондриях и в некоторых других органеллах клетки. Вблизи заряженной поверхности мембраны часть молекул воды находится в связанном состоянии (рис. 10а), и, по-видимому, они обладают повышенной электронной поляризуемостью по сравнению с обычными молекулами воды. Это может проявляться в снижении среднего по объему показателя преломления при дезэнергизации (см. Приложение). Универсальность такого объяснения зависимости рефрактерности от метаболической активности формально следует из фундаментального характера упомянутых выше (см. пп. 1 и 2) биологических и физических законов. Слой молекул связанной воды очень тонок, и прямые измерения его поляризации практически невозможны. Однако есть ряд косвенных позитивных аргументов. Например, измерения на фосфолипидных мембранах [47] подтвердили большой вклад воды в зависимость их рефрактерности от градиента потенциала. Чрезвычайная сложность обсуждаемой проблемы и ее дискуссионный характер не позволяют предложить в настоящее время разумную альтернативу гидратной гипотезе о преобладающем вкладе в рефрактерность молекул воды. Далее обсудим ее более обстоятельно.



**Рис. 10.** Механизмы появления метаболической компоненты рефрактерности. (а) В тонком слое вблизи поверхности заряженной мембраны молекулы воды (серые кружочки) имеют упорядоченную ориентацию дипольных моментов и, по-видимому, более высокую электронную компоненту восприимчивости  $\chi_3$ , чем у молекул свободной воды  $\chi_1$  (черные кружочки). Вклад белковых структур мембран, а также других "сухих" компонентов органелл в электронную поляризуемость обозначен  $\chi_2$ . (б, в) При переходе макромолекулы белка в конденсированное состояние заметно уменьшается число связанных с зарядами молекул воды и снижается вклад компоненты  $\chi_3$ . Поскольку практически все метаболические процессы (транскрипция генов, трансляция и синтез РНК, репликация ДНК) сопровождаются изменением конформации белков, то это может проявляться как в медленных, так и в быстрых флуктуациях рефрактерности. (г) Молекулы воды в гидратных оболочках ионов имеют упорядоченную ориентацию дипольных моментов, частично нарушенные водородные связи и, по-видимому, более высокую поляризуемость.

Заметим, что в многочисленных публикациях о воде практически нет сведений [48–54] о вкладе молекул воды в рефрактерность биообъектов. Нет также данных измерения или других доказательств того, что изменение показателя преломления биообъектов как-то связано с генерацией зарядов и/или с сопутствующим вкладом их гидратной оболочки. С другой стороны, известно [48–50], что вблизи гидрофильной поверхности биомембран увеличивается доля ориентированных молекул воды.

Влияние поверхностных зарядов на структуру водородных связей молекул воды имеет достаточно общий характер, и это проявлялось в колебательных спектрах молекул. В тонком слое воды вблизи заряженной поверхности мембраны в колебательных спектрах гидроксила всегда присутствовала широкая полоса  $3200\text{ см}^{-1}$ , характерная для молекул свободной воды с полным комплектом водородных связей в тетраэдрической конфигурации. Но интенсивность другой полосы в окрестности  $3400\text{ см}^{-1}$  зависела от концентрации ионов [48–50], и ее появление объяснялось частичным нарушением водородных связей или их асимметричной конфигурацией [48]. Из этого следует, что состояние поляризации части молекул воды зависело от зарядов на поверхности фосфолипидной мембраны. Кроме того, в работах авторитетных специалистов приведен еще ряд других косвенных аргументов в пользу предлагаемой гипотезы. Ввиду принципиальной важности проблемы воды и ее аномалий напомним некоторые факты и приведем ряд цитат.

П. Кремер [48] утверждает: "... Interfacial water molecules are highly ordered in comparison to bulk water and their particular structure depends on the prevailing pH. (...) Various ions able to make and break hydrogen bonds"<sup>1</sup>.

Санни Кси [49]: "...The water molecules bound to the bilayer surface are less hydrogen-bonded and exhibit a higher vibration frequency than bulk water"<sup>2</sup>.

П. Виггенс [51]: "If water, somehow, locally changed its density so that its hydrogen bonds became straighter and stronger or bent and weaker, all its physical and chemical properties must change. (...) Ling [52] had recognized this problem and proposed that intracellular water existed as polarized multilayers at protein surfaces, thus providing adequate volumes of modified water. At protein surface, some water molecules must interact directly to hydrate the surface"<sup>3</sup>. (В этой части рассматриваемая здесь гипотеза согласуется с предложенной Г. Лингом [52] теорией "polarized multilayer theory of protoplasmic water in living cells".)

Мартин Чаплин на страницах портала [54] проанализировал более тысячи работ (см., например, [48–54]), посвященных аномальным свойствам воды. Из его обзора следует, что многие конкретные биохимические процессы, происходящие в клетках, могут влиять на конфигурацию молекул воды и, следовательно, на ее макроскопические параметры.

Второй, также достаточно универсальный, механизм метаболической компоненты может быть связан, по-видимому, с конформацией (фолдингом) макромолекул белков [55, 56]. Фолдинг сопровождается почти все метаболические процессы. Например, трансляция мРНК приводит к увеличению длины полимерной цепочки аминокислот, которая спонтанно превращается в более компактную, устойчивую структуру (рис. 106, в).

Фолдинг белков в растворах может происходить через последовательность промежуточных состояний и в этих процессах решающую роль играет зарядовая конфигурация белка и взаимодействие его полярных групп с молекулами воды. Компактные конфигурации соответствуют минимуму свободной энергии и минимальной доле гидрофобной поверхности, имеющей контакт с молекулами воды. Полярные группы, наоборот, стремятся располагаться на внешней поверхности структуры и взаимодействуют с водой. На рисунке 106, в схематически показано снижение числа молекул связанной с белком воды в его "конденсированном" состоянии. Для качественного объяснения эффектов в ядрышке и ядре в рамках рассматриваемой гипотезы имеет существенное значение сам факт зависимости доли нарушенных водородных связей от пространственной структуры и конформации белка, от его зарядового состояния и от pH среды. Ионы имеют характерную гидратную обо-

лочку со связанными молекулами воды (рис. 10г), и увеличение их концентрации в цитоплазме и нуклеоплазме также может давать вклад в метаболическую компоненту рефрактерности. Поскольку транскрипция генов, трансляция и синтез РНК, репликация ДНК и практически остальные метаболические процессы сопровождаются изменением конформации белков, то изменение структуры макромолекул белка и числа нарушенных водородных связей должно влиять на интегральную рефрактерность среды. В свернутом (деэнергизованном) состоянии молекулы белка меньше открытых полярных групп и, соответственно, должна быть снижена интегральная рефрактерность. С этим выводом согласуется наблюдаемое при деэнергизации клетки [30, 31] снижение рефрактерности ядра.

Почти во всех работах по структуре и фолдингу белков [55, 56] отмечается зависимость их гидратной оболочки от конформации, функционального состояния, от ионной силы среды и многих других факторов. В частности, при более плотной упаковке ДНК, при которой прекращается транскрипция и трансляция РНК, доля молекул связанной воды снижается. Несмотря на сложность и многоплановость этих процессов, изменение гидратной оболочки ДНК при деэнергизации клетки, по-видимому, не вызывает сомнений. Приведем цитату известного эксперта по проблеме гидратной оболочки белков М. Чаплина [54]: "The extensive surface of cellular membranes (up to 100 000  $\mu\text{m}^2$ ) favor the formation of low density water inside the cell. The membrane lipids contain hydrophilic head groups that encourage this organization of the assisted interfacial water. (...) There is generally an ordered structure in the layer of water molecules immediately surrounding the protein, with both hydrophobic clathrate-like and hydrogen bonded water molecules each helping the other to optimize water's hydrogen bonding network. Protein carboxylate groups are generally surrounded by strongly hydrogen-bonded water whereas the water surrounding the basic groups arginine, histidine and lysine tends towards a more-open clathrate structuring"<sup>4</sup>.

Наконец третий, также достаточно универсальный механизм метаболической компоненты связан с оптической анизотропией макромолекул, входящих в состав цитоплазмы, нуклеоплазмы и практически всех других органелл клетки. Известно, что структуры клеточных органелл близки структурам жидких кристаллов [57], в которых существует оптическая анизотропия и фазовые переходы. Известно также, что в жидких кристаллах наблюдаются электрооптические эффекты — изменение показателя преломления при наложении внешнего электрического поля [57]. Поэтому изменения мембранного потенциала, pH, конформации белков и т.п., сопровождающие метаболические процессы, могут вызывать фазовые переходы второго рода, изменения компонент тензоров восприимчивости и показателя преломления.

<sup>1</sup> "... Молекулы внутриклеточной воды значительно более упорядочены по сравнению с обычной и ее структура зависит от pH. (...) Различные ионы способны создать и разрушить водородные связи".

<sup>2</sup> "... Молекулы воды, связанные с поверхностью бислоевой мембраны, имеют нарушенные водородные связи и имеют более высокие колебательные частоты".

<sup>3</sup> "... Если локальная плотность воды изменяется по какой-либо причине, то все ее физические и химические свойства также претерпевают изменения. (...) Г. Линг [52] предположил, что внутриклеточная вода вблизи поверхности белков существует в виде поляризованной мультислоевой модифицированной воды. Некоторые молекулы устанавливают водородные связи с белком".

<sup>4</sup> Развитая поверхность мембраны (до 100000  $\mu\text{m}^2$ ) способствует формированию внутри клетки компоненты воды малой плотности. Мембранные белки имеют как гидрофобные клатратные группы, так и гидрофильные, которые способствуют формированию оптимальной структуры водородных связей. Карбоксилатные группы обычно окружены молекулами с сильными водородными связями, в то время как молекулы воды, контактирующие с аргинином, гистидином и лизином имеют тенденцию к образованию более открытых клатратных структур".



Рассмотренными выше механизмами далеко не исчерпывается проблема зависимости рефрактерности от функционального состояния и происхождения "сигналов". Все известные процессы поляризации среды инерционны, и априори нельзя предсказать, насколько быстро будет "реагировать" рефрактерность, например, на изменения мембранного потенциала. Инерционность процессов поляризации и связанной с ними ориентации диполей может быть фактором, ограничивающим информативность "сигналов", поскольку их амплитуда должна убывать с частотой. Поэтому не удивительно преобладание в спектрах флуктуаций низкочастотных ( $F < 10$  Гц) компонент. Это, конечно, не исключает возможности существования более быстрых процессов, но для их регистрации, по-видимому, будут применяться другие методы.

В заключение остановимся на важном вопросе о связи сигналов с пространственно-временной корреляцией метаболических процессов. Движения отдельных макромолекул нельзя было бы различить из-за ограниченного пространственного разрешения, даже если бы связанные с ними сигналы имели достаточную амплитуду. Интерференционными методами различаются только макроскопические изменения поляризации среды. Поэтому следует рассмотреть фундаментальные причины, ограничивающие минимальный объем среды, в которой изменения рефрактерности могут быть обнаружены в виде оптического "сигнала".

Условием обнаружения "сигнала" является существование в этом объеме  $\Delta V$  коррелированных в пространстве-времени изменений рефрактерности с амплитудой  $\delta n$ . В этом приближении можно определить минимальное значение произведения  $\delta n \Delta V$ , которое может быть обнаружено в виде сигнала с амплитудой  $\delta h = (\Delta V \delta n) / S$ , превосходящей предельную чувствительность  $\langle \Delta h \rangle$  измерительного устройства при данном пространственном разрешении  $S$  (см. Приложение). Из этого следует, что интерференционными методами можно обнаружить только такие сигналы, которые связаны с макроскопическими изменениями параметров среды и вызваны кооперативными процессами в клетках и органеллах [11, 27].

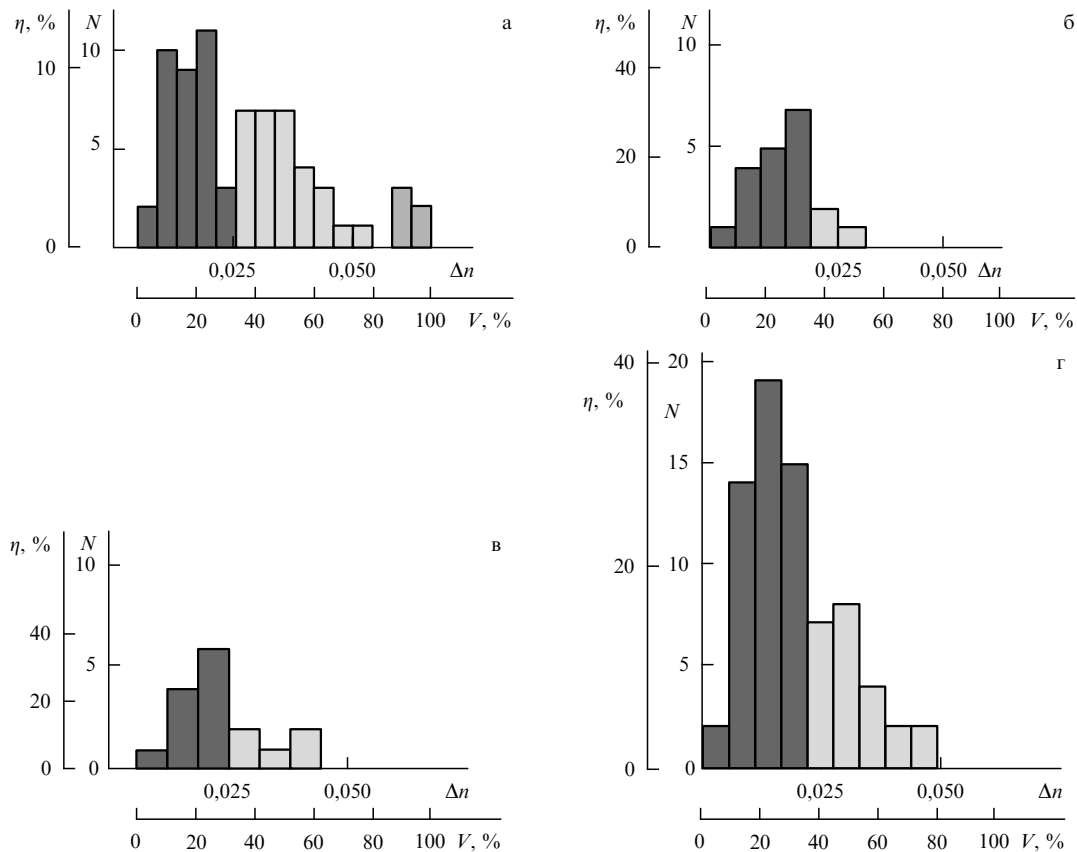
## 7. Проблемы "языка" клетки, "диалога" и биологической интерпретации сигналов

"Диалог" с объектом лежит в основе биологических экспериментов по схеме структура–функция, ориентированных на получение информации о метаболических процессах (функциях) по данным морфологии о структуре объекта. Непосредственная регистрация сигналов, например, в виде флуктуаций мембранного потенциала [4, 5] эквивалентна введению нового измерения или канала информации в схему сигнал–структура–функция. Временной сигнал не только существенно расширяет возможности "общения" с объектом, но позволяет также перевести его на более высокий уровень интерактивного "диалога" в реальном времени. Напомним, что в общем случае под сигналом понимаются все характерные признаки пространственно-временной структуры, независимо от его физической природы. В частности, это могут быть видео- и аудиосигналы, полученные не только оптическими методами интерференционной микроскопии. В рассматриваемом здесь конкретном примере сигнал был представлен на трек-диаграмме в

виде флуктуаций фазовой толщины. Нетривиальность предлагаемого "семантического" подхода состоит в гипотезе, согласно которой измеряемые в реальном времени сигналы содержат объективную и содержательную информацию на "языке" клетки, понятном экспериментатору. Под "языком" мы в данном случае понимаем совокупность характерных признаков в сигналах, по которым их можно различать и отождествлять с конкретными процессами в клетке. Проблема распознавания и интерпретации сигналов имеет междисциплинарный характер, и для ее решения в конкретных дисциплинах разработаны эффективные аппаратные и технические средства. Достаточно указать проблему языкового перевода в реальном времени, предсказание землетрясений и анализ энцефалограмм. Для однозначного отождествления сигналов с конкретными метаболическими процессами в исследуемом объекте нужен "словарь", способы создания которого сейчас еще не вполне ясны. Проблема "словаря" осложняется также неоднозначностью состояния клетки, поскольку она может находиться в разных периодах цикла, отличаться энергизацией, предысторией и другими индивидуальными признаками. Поэтому вопрос о возможности создания "словаря", адекватности и однозначности его терминов требует отдельной дискуссии. Заметим, что и сама идея использования рефрактерности как адекватного параметра, характеризующего функциональное состояние, в ряде случаев вызывает неоднозначную реакцию.

Тем не менее в определенных ситуациях можно предложить конкретные решения. В биофизике клетки известно большое число способов влиять на функциональное состояние клетки. Это позволяет осуществить целенаправленные измерения сигналов, связанных с определенными кооперативными процессами. Для иллюстрации очень частного случая обратимся к приведенному выше примеру сигналов ядрышка. Выше отмечалось, что его основная функция (синтез пре-рибосом) реализуется в результате кооперативного процесса — синхронного движения сотни РНК-полимераз I (см. обзоры в [37–44]). Другие процессы в ядрышке, по-видимому, не связаны непосредственно с транскрипцией и синхронизмом Pol I. Это обстоятельство значительно упрощает отождествление сигналов с функциональным состоянием ядрышка и позволяет произвести количественное сравнение их параметров с данными, полученными альтернативными методами. Предварительные результаты экспериментов с актиномицином Д (ингибитором транскрипции), афидиколином (ингибитором репликации ДНК), винкристином (ингибитором синтеза микротрубок) показали корреляцию фазовых изображений и функционального состояния клетки НСТ 116 [29].

В заключение приведем результаты предварительных исследований, подтверждающих реалистичность интерпретации фазовых изображений ядрышка. Как известно, интенсивность синтетических процессов в ядрышке является одним из индикаторов функционального состояния клетки [37–42]. При активном синтезе пре-рибосом, в частности в опухолевых клетках, его размер и контраст увеличиваются. Измерения, проведенные в МИРЭА, подтвердили существование корреляции между рефрактерностью ядрышка и функциональным состоянием клетки. На рисунке 11 приведены гистограммы рефрактерности ядрышек интактных клеток и при дей-



**Рис. 11.** Влияние ингибиторов на рефрактерность ядрышка и "жизнеспособность" субпопуляций клеток НСТ 116. (а). В гистограмме интактных клеток видны три субпопуляции с относительными "весами"  $\eta$ , средней рефрактерностью  $\langle \Delta n \rangle$  и относительной "жизнеспособностью" этих групп клеток  $\langle V \rangle$ . (б). При действии афидиколина исчезла активная субпопуляция и увеличилась до  $\eta = 85\%$  доля клеток с низкой активностью. (в). Аналогичный эффект произвело введение в среду ротенона и разобшителя, которые блокируют ферменты дыхательной цепи митохондрий и синтез АТФ. При этом прекращается энергизация метаболических процессов. (г) Введение винкристина приводит к блокированию синтеза микротрубочек, по которым транспортируются в ядро белки. Результатом явилось увеличение доли клеток с малой рефрактерностью.

ствии различных ингибиторов. В интактных клетках НСТ 116 (рис. 11а) присутствовали три субпопуляции с рефрактерностью  $\langle \Delta n \rangle \cong 0,015$ ;  $0,035$  и  $0,065$ , "жизнеспособностью"  $\langle V \rangle \cong 15$ ;  $50$  и  $90\%$  и "весами" ядрышек  $\eta_{\Sigma} = 50$ ;  $43$  и  $7\%$ . При блокировании ДНК-полимеразы и репликации хромосом афидиколином в гистограмме на рис. 11б наблюдались только две субпопуляции в состояниях  $\langle \Delta n \rangle \cong 0,015$  и  $0,025$  с  $\langle V \rangle \cong 30$  и  $45\%$ ,  $\eta_{\Sigma} = 85$  и  $15\%$ . При блокировании первого комплекса дыхательной цепи митохондрий введением ротенона и разобшителя SF6847 субпопуляции имели параметры  $\langle \Delta n \rangle \cong 0,015$  и  $0,03$ ,  $\langle V \rangle \cong 20$  и  $50\%$ ,  $\eta_{\Sigma} = 70$  и  $30\%$ . Введение винкристина, который блокирует полимеризацию микротрубочек, также влияло на рефрактерность ядрышек. Субпопуляции имели параметры  $\langle \Delta n \rangle \cong 0,012$  и  $0,03$ ,  $\langle V \rangle \cong 20$  и  $55\%$ ,  $\eta_{\Sigma} = 70$  и  $30\%$ . Из результатов этих предварительных измерений следует возможность количественной оценки отклика клетки на цитотоксические факторы. Но пока нет объяснения, почему различные ингибиторы вызывали почти одинаковый отклик ядрышка.

Наконец, кратко остановимся на проблеме параметра, адекватного задаче определения состояния (энергизации) клетки и ее органелл. Этот макроскопический

параметр биообъекта должен иметь четкое физическое содержание и понятный механизм зависимости от метаболических процессов. Одним из основных результатов работы можно считать введение метаболической компоненты параметра восприимчивости ( $\chi_3$  или рефрактерности  $\delta n = \langle \Delta n \rangle_{\max} - \langle \Delta n \rangle_{\min}$ ) для количественной характеристики функционального состояния клетки. Этот параметр доступен прямым, почти неинвазивным оптическим измерениям. Метаболическая компонента рефрактерности в этом смысле является альтернативой и количественной характеристикой менее конкретного термина "энергизации". Из рисунков 5, 6 и 11 следует, что параметры  $\langle \Delta n \rangle$ ,  $\langle V \rangle$  и  $\eta_{\Sigma}$  могут характеризовать также гетерогенность популяций. Представление гистограмм в координатах  $\eta(V)$  может быть полезным для количественной оценки эффективности действия внешних факторов, диагностики промежуточных состояний, неоднородности распределения и т.п. К достоинствам такого представления следует отнести возможность измерения в реальном времени, не критичность к механизму зависимости рефрактерности от характера метаболических процессов. Временные изменения распределения  $\eta(V)$  могут быть характеристикой скорости ответа клетки на изменение внешних условий.

## 8. Заключение

В статье изложено видение проблемы "диалога" с позиций автора, физика по образованию, который не имеет систематических знаний в биологии. Решение этой междисциплинарной проблемы позволит понять механизм самоорганизации "симфонического" оркестра клетки, заглянуть в глубины происхождения жизни. Несмотря на фантастическую сложность и многогранность затронутых вопросов, полученные в течение 10-летнего опыта результаты по медико-биологическим применениям когерентной фазовой микроскопии и прогресс в разработке новых методов [11, 12, 19–23] позволяют надеяться, что в недалеком будущем в биофизике клетки, в молекулярной медицине, гематологии, иммунологии и фармакологии появятся открытия фундаментального значения.

Кроме ожидаемых фундаментальных результатов этот метод будет иметь практическое значение для биофизики клетки, нейробиологии [58] и молекулярной медицины. Действительно, обоснование метода измерения метаболической компоненты рефрактерности и введение параметров  $\chi_3$ ,  $\delta n_{\max} = \langle \Delta n \rangle_{\max} - \langle \Delta n \rangle_{\min}$  (или "жизнеспособности"  $\delta n / \delta n_{\max} = V$ ) имеет принципиальное значение для количественной характеристики функционального состояния клетки. Представление гистограмм в координатах  $\eta(V)$  может быть полезным для количественной оценки эффективности действия внешних факторов, диагностики состояния, неоднородности распределения и т.п. В качестве примеров отметим также проблему резистентности клеток к действию лекарственных препаратов, тесты на индивидуальную реакцию на чужеродные белки, на оценку вероятности отторжения тканей при трансплантации, на экспресс-диагностику рака и жизнеспособности клеток. Временные изменения распределения  $\eta(V)$  могут быть характеристикой скорости ответа клетки на изменение внешних условий.

К достоинствам современных методов относятся: возможность измерений в реальном времени, представление результатов в количественной форме, достаточно широкая универсальность и не критичность к механизму метаболических процессов.

Ранее было отмечено, что в современных биофизических методах еще не в полной мере реализуются достижения оптоэлектроники. Существует огромный, пока неиспользованный, резерв новых способов регистрации, отображения и анализа сигналов, основанных на современной элементной базе. Современная элементная база и компьютерная техника позволяют значительно улучшить параметры микроскопов [23].

## 9. Приложение

Свойства многокомпонентной оптической среды принято описывать в терминах электронной восприимчивости. В предположении, что в суммарную восприимчивость  $\chi_{\Sigma}$  среды дают аддитивные вклады только три компоненты — молекулы обычной воды ( $\chi_1$ ), "сухая" субстанция ( $\chi_2$ ) и метаболическая компонента ( $\chi_3$ ), для среднего показателя преломления среды  $n_{\Sigma}$  и диэлектрической постоянной  $\varepsilon$  справедлива формула,

$$\varepsilon = (1 + \chi_{\Sigma}) = n_{\Sigma}^2. \quad (1)$$

Заметим, что использование  $\chi_3$  для характеристики физических изменений среды более корректно, чем разности  $\delta n = \langle \Delta n_{\max} \rangle - \langle \Delta n_{\min} \rangle$ . Для метаболического и дезэнергизованного состояний формула (1) соответственно принимает вид

$$\begin{aligned} \varepsilon_{\max} &= (n_1 + \langle \Delta n_{\max} \rangle)^2 = 1 + \chi_1 + \chi_2 + \chi_3 \quad \text{и} \\ \varepsilon_{\min} &= (n_1 + \langle \Delta n_{\min} \rangle)^2 = 1 + \chi_1 + \chi_2, \end{aligned} \quad (2)$$

где  $n_1 = n_0 = 1,33$ . Из (2) следуют для метаболической и "сухой" компонент формулы

$$\begin{aligned} \chi_3 &= (2n_1 + \langle \Delta n_{\max} \rangle + \langle \Delta n_{\min} \rangle)(\langle \Delta n_{\max} \rangle - \langle \Delta n_{\min} \rangle), \\ \chi_2 &\cong 2 \langle \Delta n_{\min} \rangle n_1. \end{aligned} \quad (3)$$

Для митохондрии при значениях  $\langle \Delta n_{\min} \rangle \cong 0,02$ ,  $\langle \Delta n_{\max} \rangle \cong 0,07$  и  $n_1 = 1,33$  из (3) следует:  $\chi_1 = 0,77$ ,  $\chi_2 = 0,053$ ;  $\chi_3 = 0,137$ .

Таким образом, для относительных вкладов в поляризацию "сухой" и метаболической компонент можно получить парадоксальные оценки  $\chi_2/\chi_1 \cong 7\%$  и  $\chi_3/\chi_1 \cong 18\%$ . Парадокс состоит в значительном превышении метаболической компоненты над "сухой". Действительно, при быстром ингибировании метаболизма изменяется энергизация среды, но ее химический состав, определяющий "сухую" компоненту.

Заметим также, что для энергизованной митохондрии можно определить плотность зарядов на мембране. При характерном значении мембранного потенциала  $\Delta \Psi \cong 100$  мВ и удельной емкости мембраны  $C_0 = 1$  мкФ см<sup>-2</sup> плотность зарядов на ее поверхности определяется формулой  $q = \Delta \Psi C_0$ . Из этого следует оценка  $q \cong 10^{-7}$  Кл см<sup>-2</sup> или поверхностная плотность составляет около  $10^4$  элементарных зарядов на 1 мкм<sup>-2</sup>. Ей соответствует расстояние между зарядами на поверхности внутренней мембраны около 10 нм. В этом случае при радиусе гидратной оболочки ионов 2–3 нм доля молекул связанной воды не будет превышать 10%.

Для оценки минимальной амплитуды сигнала  $\delta h$ , который можно обнаружить в корреляционном объеме  $\Delta V$  с амплитудой флуктуации  $\delta n$ , будем исходить из предположения, что она ограничивается шумами установки  $\langle \Delta h \rangle$  и ее пространственным разрешением. В качестве характеристики разрешения примем площадь  $S$  реально разрешаемого элемента в фазовом изображении. Она может быть меньше площади диска Эйри, но должна превышать площадь  $S$  одного пикселя. Тогда для оценки амплитуды, возникающей при усреднении возмущения по площади элемента изображения, можно принять условие  $\delta h = \Delta V \delta n / S \geq \langle \Delta h \rangle$ . Для иллюстрации реалистичности этого условия приведем численный пример. В измерениях сигналов ядрышка при чувствительности  $\langle \Delta h \rangle = 1$  нм,  $S = 0,03$  мкм<sup>2</sup> это приводит к неравенству  $\Delta V \delta n > 3 \times 10^{-5}$  мкм<sup>3</sup>. Следовательно, при амплитуде рефрактерности  $\delta n = 0,03$  минимальный объем пространственно коррелированных флуктуаций составит  $\Delta V = 10^{-3}$  мкм<sup>3</sup>, что соответствует радиусу корреляции около 0,1 мкм. Из формулы

$$\chi_3 \cong 2n_1 (\langle \Delta n_{\max} \rangle - \langle \Delta n_{\min} \rangle) = 2n_1 \delta n$$

также следует достаточно большая ( $\delta \chi_3 \cong 8\%$ ) амплитуда метаболической компоненты восприимчивости.

**Благодарности.** Приведенные в статье результаты измерений были получены в лаборатории "Когерентной оптики" МИРЭА в течение 1995–2006 гг. Автор считает своим приятным долгом выразить благодарность всему коллективу лаборатории и отметить основных участников. Разработкой микроскопа занимались И.В. Мазалов, Д.В. Ублинский, С.И. Клушин. Первые измерения биообъектов произвели А.В. Тавров, Г.Е. Куфаль, Е.В. Переведенцева и Т.В. Вышенская. Наиболее заметный вклад в измерения, их обработку и развитие программного обеспечения в последние годы сделан А.В. Кретушевым. Подготовку биообъектов, их измерения и интерпретацию результатов производила в течение многих лет Т.В. Вышенская. В систематических измерениях клеток принимали участие И.В. Клемяшов, Е.Н. Славнова, В.В. Лисовский и А.Б. Иванов. Совместные публикации были результатом плодотворных дискуссий и сотрудничества с А.А. Штилем, А.Н. Тихоновым, Л.С. Ягужинским, О.В. Зацепиной, И.В. Василенко, Г.И. Эль-Регистан, Г.В. Максимовым, И.В. Решетовым и Д.Г. Вайсом. Работа выполнялась при поддержке гранта РФФИ (№ 07-04-00473).

## Список литературы

- Rapp P E *J. Exp. Biology* **81** 281 (1979)
- Wang Y et al. *J. Cell Biol.* **174** 481 (2006)
- Скулачев В П *Биоэнергетика. Мембранные преобразователи энергии* (Биохимия мембран, Кн. 6, Под ред. А А Болдырева) (М.: Высшая школа, 1989)
- Hüser J, Blatter L A *Biochem. J.* **343** 311 (1999)
- Hattori T et al. *Biophys. J.* **88** 2340 (2005)
- Brehm-Stecher B F, Johnson E A *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68** 538 (2004)
- Ченцов Ю С *Введение в клеточную биологию* 4-е изд. (М.: Академкнига, 2004)
- Naito Y, Toh-e A, Hamaguchi H *J. Raman Spectrosc.* **36** 837 (2005)
- Huang Y-S et al. *J. Raman Spectrosc.* **35** 525 (2004)
- Cheng J-X et al. *Biophys. J.* **83** 502 (2002)
- Тычинский В П *УФН* **171** 649 (2001)
- Тычинский В П и др. *Квантовая электроника.* **24** 754 (1997)
- Carl D et al. *Appl. Opt.* **43** 6536 (2004)
- Lazebnik M et al. *Opt. Lett.* **28** 1218 (2003)
- Vishnyakov G et al. *Microsc. Analysis* **18** (1) 19 (2004)
- Langoju R, Patil A, Rastogi P *Opt. Express* **13** 7160 (2005)
- Kleinfeld, Laporta A, in *Light Scattering Imaging Neural Tissue Function* (Eds D M Rector, J S George) (Totowa, NJ: Humana Press, 2006)
- Millerd J E et al. *Proc. SPIE* **5531** 304 (2004)
- Rappaz B et al. *Opt. Express* **13** 9361 (2005)
- Popescu G et al. *J. Biomed. Opt.* **10** 060503 (2005)
- Ikeda T et al. *Opt. Lett.* **30** 1165 (2005)
- Lue N et al. *Opt. Lett.* **31** 2759 (2006)
- Park Y et al. *Opt. Express* **14** 8263 (2006)
- Tychinsky V, Kretushev A, Vyshenskaja T *Eur. Biophys. J.* **33** 700 (2004)
- Tychinsky V P et al. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) — Biomembranes* **1665** 57 (2004)
- Tychinsky V P et al. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) — Bioenergetics* **1708** 362 (2005)
- Тычинский В П и др. *Биофизика* **45** 870 (2000)
- Тычинский В П и др. *Докл. РАН* **405** 550 (2005)
- Тычинский В П и др. *Бюлл. экп. биол. и мед.* **142** 465 (2006)
- Чиссов В И и др. *Росс. онкологический журн.* (2) 11 (2006)
- Tychinsky V P et al., in *Technical Proc. of the 2006 NSTI Nanotechnology Conf. and Trade Show* Vol. 2 (2006) (CDROM) Ch. 1
- Кретушев А В, Тычинский В П *Квантовая электроника.* **32** (1) 66 (2002)
- Tychinsky V P *Opt. Commun.* **74** 41 (1989)
- Тычинский В П и др. *Письма в ЖТФ* **17** (22) 80 (1991)
- Microbiology by Lim, 2nd Edition, <http://www.mhhe.com/biosci/cellmicro/limmicro/>
- Derenzini M et al. *J. Histochem. Cytochem.* **54** 131 (2006)
- Dundr M, Misteli T *Biochem. J.* **356** 297 (2001)
- Cheutin T et al. *J. Cell. Science* **115** 3297 (2002)
- Raška I, Shaw P J, Cmarko D *Current Opin. Cell Biol.* **18** 325 (2006)
- Lam Y W, Trinkle-Mulcahy L, Lamond A I *J. Cell. Science* **118** 1335 (2005)
- White R J *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **6** 69 (2005)
- Mayer C, Bierhoff H, Grummt I *Genes Dev.* **19** 933 (2005)
- Dundr M et al. *Science* **298** 1623 (2002)
- Grummt I *Genes Dev.* **17** 1691 (2003)
- Jackson D A, Pombo A, Iborra F *FASEB J.* **14** 242 (2000)
- Шевкунов С В *Хим. высоких энергий* **39** (6) (2005)
- Тычинский В П и др. *Биол. мембраны* **22** (2) 131 (2005)
- Gurau M C et al. *ChemPhysChem* **4** 1231 (2003)
- Cheng J-X et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100** 9826 (2003)
- Kim J, Kim G, Cremer P S *Langmuir* **17** 7255 (2001)
- Wiggins P M *Cell Mol. Biol.* **47** 735 (2001)
- Ling G, in *Interfacial Water in Cell Biology, Conf., South Hadley, MA, USA, June 6–11, 2004*
- Pollack G H *Cells, Gels and the Engines of Life: a New Unified Approach to Cell Function* (Seattle, WA: Ebner & Sons, 2001)
- Chaplin M "Water structure and behavior", <http://www.lsbu.ac.uk/water/>; "Nucleic acid hydration", <http://www.lsbu.ac.uk/water/nucleic.html>
- Chen S-J, Dill K A *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97** 646 (2000)
- Li L, Mirny L A, Shakhnovich E I *Nature Struct. Biol.* **7** 336 (2000)
- Пикин С А *Структурные превращения в жидких кристаллах* (М.: Наука, 1981)
- Максимов Г В и др. *Биофизика* **47** 345 (2002)

## Dynamic phase microscopy: is "dialogue" with a cell possible?

V.P. Tychinskii

Moscow State Institute of Radio Engineering, Electronics and Automatics (Technical University)

Prosp. Vernadskogo 78, 119454 Moscow, Russian Federation

Tel. (7-495) 434-6792. Fax (7-495) 434-86 65

E-mail: vtych@yandex.ru

The metabolic component of refractivity is considered as a quantifying parameter for the 'vitality' of cells and organelles. It is shown that intracellular processes can be studied by the dynamic phase microscopy method, which provides real-time information in the form of local changes in the optical path difference. Preliminary results demonstrate the possibility to localize 'signal' and to obtain information under the signal-structure-functions scheme; and show prospects for conducting 'dialogue' with a cell by registering in real time the way in which it responds to changes in external conditions. The dependence of refractivity on metabolic states is explained by the contribution of bound water molecules.

PACS numbers: **07.60.-j**, **87.16.-b**, **87.64.-t**

Bibliography — 58 references

Received 1 February 2007