

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
ФИЗИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ им. П.Н.ЛЕБЕДЕВА

На правах рукописи

УДК 535.4

Демьянов Георгий Витальевич

Поляризационные характеристики синхротронного излучения и развитие
методов измерения затухания интенсивности и анизотропии
флуоресценции молекул

01.04.05 – оптика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Москва - 2007

Работа выполнена в лаборатории электронов высоких энергий
Физического института им. П.Н.Лебедева Российской Академии Наук

Научный руководитель:

Кандидат физико-математических наук Сырейщикова Татьяна Ивановна

Официальные оппоненты:

Доктор физико-математических наук Кудрявцев Евгений Михайлович

Кандидат физико-математических наук Колобанов Виталий Николаевич

Ведущая организация:

Научно-исследовательский институт ядерной физики им. Д.В.Скобельцына
МГУ им. М.В.Ломоносова

Защита состоится 15 октября 2007 г. в 12 часов на заседании Диссертационного
совета Д002.023.02 Физического института им. П.Н.Лебедева РАН по адресу:
119 991, Москва, Ленинский проспект 53.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке
Физического института им. П.Н.Лебедева РАН

Автореферат разослан «_____» _____ 2007 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор физико-математических наук

А.С.Шиканов

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

В настоящее время метод флуоресцентной спектроскопии является одним из наиболее информативных методов исследования как биологических структур, так и многих химических соединений. Основными преимуществами этого метода при изучении биологических систем являются его высокая чувствительность, отсутствие деструктивного воздействия (сохранение нативности образца во время измерений), а также селективность возбуждения. Именно благодаря этому роль метода флуоресцентной спектроскопии в создании современного представления о структуре и функциях таких биологических структур как липопотеины, альбумины, клетки крови, биологические мембраны и т.д., связанных с жизнедеятельностью человека, является общепризнанной. Ранние применения флуоресцентной спектроскопии касались, главным образом, исследования влияния микроокружения флуоресцирующего соединения на его спектры испускания и интенсивность флуоресценции. Бурное развитие лазерной техники и, в первую очередь, применение ускорителей в качестве специализированных источников синхротронного излучения (СИ) обусловило быстрый прогресс в разработке методов флуоресцентной спектроскопии с временным разрешением. Безусловно, лабораторные источники света являются более доступными, однако, применение ускорителей в качестве специализированных источников СИ обладает рядом несомненных преимуществ - это широкий и непрерывный спектральный диапазон, высокая стабильность временной структуры импульсов, обеспечение низкой мгновенной мощности облучения исследуемого объекта, высокая степень линейной поляризации. В последнее время основное внимание уделяется методу флуоресцентной спектроскопии с временным разрешением, который позволяет получать дополнительную и более детальную информацию об объекте исследования, изучать тонкие механизмы динамики и конформационных перестроек в исследуемых объектах. Метод флуоресцентной спектроскопии предполагает использование как природных флуорофоров, так и специально синтезированных флуоресцирующих молекул, обладающих необходимыми свойствами, ковалентно или нековалентно связывающихся с исследуемым

объектом (соответственно “флуоресцентных меток” и “флуоресцентных зондов”). Временные параметры флуоресценции этих молекул сильно зависят от свойств окружения флуорофора. Поэтому, точное знание закона затухания флуоресценции может дать детальную информацию об окружении флуорофора и его взаимодействии с этим окружением. Такие разрешенные во времени измерения позволяют исследовать сложные гетерогенные системы и следить за популяциями молекул флуорофора, находящимися в различном окружении, или исследовать процессы, протекающие в возбужденном состоянии. При возбуждении флуорофора линейно поляризованным светом испускание флуоресцирующей молекулы также поляризовано. Со временем поляризация флуоресценции падает по ряду причин. Наиболее распространенной из них является вращательная диффузия флуорофора, параметры которой зависят от вязкости растворителя, размеров и формы вращающихся частиц. На величину анизотропии также влияет наличие ограничений на ориентацию флуорофора. Зависимость анизотропии флуоресценции от вращательной диффузии излучающей молекулы привела к применению метода измерения затухания анизотропии в биохимических и биомедицинских исследованиях.

С учетом выше изложенного являлось актуальным создание рабочей станции в пучке СИ ускорителя С-60 Физического институт им. П.Н.Лебедева РАН (ФИАН), разработка и внедрение различных методик исследований биологических структур флуоресцентными методами с временным разрешением.

Цель работы

Целью настоящей работы было создание действующей экспериментальной станции в пучке СИ ускорителя С-60 ФИАН для исследования вращательной динамики биологических структур и молекул, развитие методики флуоресцентной спектроскопии с временным разрешением, а также изучение поляризационных характеристик синхротронного излучения в неоднородном магнитном поле с использованием метода параметров Стокса; исследование зависимости поляризации СИ от аксиальных бетатронных колебаний ускоряемых электронов и изучение возможности их подавления путем вариации магнитного поля ускорителя,

корректируя при этом поляризационные характеристики излучения. Необходимость работы с малыми количествами исследуемых веществ потребовала разработки оригинального метода детектирования флуоресценции, отличающегося от общепринятого.

Основные задачи, решаемые в диссертации

В представленной диссертации были поставлены и решены следующие задачи:

- Проведено экспериментальное исследование поляризационных характеристик синхротронного излучения ускорителя С-60 ФИАН. Изучено влияние аксиальных бетатронных колебаний ускоряемых электронов на указанные характеристики СИ и исследованы возможности коррекции этих характеристик путем вариации магнитного поля ускорителя. Получены формулы, описывающие угловые распределения параметров Стокса и поляризационных характеристик СИ, учитывающие амплитуды бетатронных колебаний ускоряемых электронов.

- Разработана и отлажена система детектирования флуоресценции с временным разрешением. Для регистрации излучения используется метод счета одиночных фотонов, который является наиболее чувствительным методом, доступным в настоящее время для измерения времен затухания флуоресценции.

- Отработан метод флуоресцентных зондов для исследования биологических объектов. Этот метод имеет высокую чувствительность, дает возможность проводить измерения с живыми биологическими системами и, в частности, исследовать структуру живой клетки. В отличие от рентгеноструктурного анализа, метод позволяет исследовать объекты, не имеющие строго упорядоченной структуры.

- Отлажен метод измерения анизотропии флуоресценции с временным разрешением.

- Разработан и внедрен ряд различных методик исследований биологических объектов флуоресцентными методами с временным разрешением: методика измерения времен затухания интенсивности флуоресценции и методика измерения параметров затухания анизотропии флуоресценции.

- Разработан метод анализа измеренных кривых затухания интенсивности и анизотропии флуоресценции, для чего был создан и отлажен ряд программ для анализа экспериментальных данных, основанных на нелинейном методе наименьших квадратов.

Научная новизна работы

В работе теоретически и экспериментально изучены все основные поляризационные характеристики синхротронного излучения в неоднородном магнитном поле, причем впервые в экспериментальных исследованиях поляризации СИ применен метод параметров Стокса, адекватно отражающий важнейшие характеристики эллиптической поляризации излучения. Впервые получены экспериментальные данные измерения угловых распределений параметров Стокса СИ, линейной, циркулярной и полной степени поляризации.

Экспериментально подтверждено предсказанное ранее теоретически наличие двух минимумов в угловом распределении степени поляризации СИ, расположенных симметрично относительно плоскости равновесной орбиты электронов. Таким образом, показано, что максимальная деполяризация излучения имеет место не в плоскости орбиты, как считалось ранее, а в направлении некоторого угла, величина которого зависит от величины амплитуды аксиальных бетатронных колебаний ускоряемых электронов.

Результатом проведенной работы явилось создание на базе синхротрона С-60 ФИАН экспериментальной станции предназначенной для исследования затухания интенсивности и анизотропии флуоресценции биологических структур, находящихся в растворе и продемонстрированы ее возможности.

Практическая значимость работы

В работе развит применительно к СИ метод параметров Стокса, полученные формулы позволяют учесть деполяризацию излучения за счет аксиальных бетатронных колебаний электронов. Показано, что путем вариации магнитного поля ускорителя возможно значительно уменьшить амплитуду аксиальных бетатронных колебаний электронов, скорректировав тем самым поляризационные

характеристики излучения, и получить источник практически полностью поляризованного света в широком спектральном диапазоне, при этом степень линейной поляризации излучения в плоскости орбиты электронов приближается к 100%.

С созданием экспериментальной станции приобрел новые возможности и стал более эффективным подход к исследованию молекулярной динамики биологических структур, связанный с использованием метода измерения анизотропии флуоресценции с временным разрешением. Исследование на данной станции белково-липидных комплексов крови человека с использованием метода разрешенной во времени флуоресцентной спектроскопии открывает совершенно новые возможности для контроля и ранней диагностики ряда серьезных заболеваний человека, например, таких как атеросклероз.

Защищаемые положения

- теоретически и экспериментально показано, что аксиальные бетатронные колебания являются основным деполяризующим фактором относительно СИ;
- доказано, что путем вариации магнитного поля ускорителя можно подавить указанные колебания и значительно увеличить степень поляризации СИ;
- на базе синхротрона С-60 ФИАН с учетом поляризационных характеристик излучения создана установка для измерения параметров затухания интенсивности и анизотропии флуоресценции молекул, находящихся в растворе и продемонстрированы ее возможности.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, пяти глав, выводов и списка цитируемой литературы. Полный объем диссертации составляет 121 страницу машинописного текста. Диссертация включает 25 рисунков и 2 таблицы. Список цитируемой литературы насчитывает 73 наименования.

Апробация работы

Основные результаты диссертации представлены на Международной конференции по синхротронному излучению СИ-90 (Москва, 1990), Международной конференции по люминесценции (Москва, 1994), XIV Российской конференции по использованию синхротронного излучения (Новосибирск, 2002), Третьей международной конференции молодых ученых и специалистов “Оптика-2003” (Москва, 2003), а также докладывались на научных семинарах Лаборатории электронов высоких энергий Отделения ядерной физики и астрофизики ФИАН и Отделения оптики ФИАН.

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Во введении обоснована актуальность темы диссертации, сформулированы цель и задачи работы, кратко описана научная новизна работы, а также ее практическая значимость.

Первая глава диссертации является обзорной.

Первый параграф посвящен рассмотрению работ, связанных с формированием и развитием классической теории синхротронного излучения, рассмотрены основные этапы становления и современное состояние теории СИ. Описаны поляризационные свойства СИ и рассмотрены основные теоретические и экспериментальные работы по исследованию поляризационно-угловых свойств излучения. Отмечено, что анализ экспериментальных данных, полученных в большинстве этих работ, недостаточно верен с методической точки зрения, так как в них эллиптическая поляризация рассматривалась неадекватными методами, а именно, только с точки зрения либо компонент линейной, либо циркулярной поляризации. При удовлетворительном, в целом, согласии теории и эксперимента имеет место расхождение экспериментальных данных с теоретическими, касающиеся отличия от нуля интенсивности в минимуме π -компоненты линейной поляризации, вектор электрического поля которой параллелен направлению внешнего магнитного поля ускорителя.

Во втором параграфе рассмотрена динамика электронов в ускорителях в неоднородном слабофокусирующем магнитном поле. Приведены основные выводы теории, касающиеся поведения пучка электронов в процессе ускорения, дана сравнительная характеристика различных типов колебаний ускоряемых электронов вблизи равновесной орбиты, их возможного влияния на поляризационные характеристики излучения. Проанализированы работы, в которых рассматривались влияния аксиальных бетатронных колебаний на угловые распределения компонент линейной поляризации СИ.

Третий параграф посвящен рассмотрению методов описания поляризованного света с помощью формализма вектора Джонса, параметров Стокса и матрицы когерентности. Указанный метод, широко используемый в эллипсометрии, до последнего времени не использовался в экспериментах с СИ. Различные состояния поляризации плоской световой волны можно представить набором четырех величин, называемых параметрами Стокса. Экспериментальное определение параметров Стокса основано на выражениях:

$$S_0 = I_0 + I_{90} = I_{+45} + I_{-45} = I_R + I_L \quad (1a)$$

$$S_1 = I_{90} - I_0 \quad (1б)$$

$$S_2 = I_{+45} - I_{-45} \quad (1в)$$

$$S_3 = I_R - I_L, \quad (1г)$$

где параметр Стокса S_0 равен полной интенсивности излучения, а через I_0 , I_{90} , I_{+45} , I_{-45} , I_R и I_L обозначены интенсивности, прошедшие через поляризаторы, ориентированные под углами 0^0 , 90^0 , $\pm 45^0$ к вертикали, и круговые поляризаторы правого и левого вращения соответственно. При изучении поляризационных свойств излучения пользуются нормированными (или приведенными) параметрами Стокса ξ_1 , ξ_2 , ξ_3 , где $\xi_i = S_i / S_0$, $i = 1, 2, 3$, которые несут полную информацию о поляризации. Если рассматривать ξ_1 , ξ_2 и ξ_3 как совокупность декартовых координат некой точки, соответствующей данной поляризации, то мы приходим к представлению состояний поляризации в виде сферы Пуанкаре. Сферические координаты точки на сфере в этом случае имеют важный физический смысл:

азимутальный угол равен удвоенному углу φ наклона большой оси эллипса поляризации к оси x рассматриваемой системы координат

$$2 \varphi = \arctg(\xi_2/\xi_1), \quad (2)$$

полярный угол равен удвоенному углу эллиптичности δ – отношению длин малой и большой полуосей эллипса

$$2 \delta = \arcsin \left(\frac{x_3}{\sqrt{x_1^2 + x_2^2 + x_3^2}} \right), \quad (3)$$

а расстояние точки от начала координат есть степень поляризации P . Линейная, циркулярная и полная степени поляризации определяются через приведенные параметры Стокса:

$$P_1 = \sqrt{x_1^2 + x_2^2} \quad (4a)$$

$$P_c = |\xi_3| \quad (4б)$$

$$P = \sqrt{x_1^2 + x_2^2 + x_3^2}. \quad (4в)$$

Показано, что величины P_1 и P_c являются инвариантами относительно вращения системы координат в плоскости $xу$, перпендикулярной направлению распространения излучения.

В четвертом параграфе получены формулы для углового распределения приведенных параметров Стокса СИ в неоднородном магнитном поле, учитывающие амплитуды аксиальных бетатронных колебаний электронов.

Вторая глава посвящена экспериментальному исследованию поляризационных характеристик СИ ускорителя С-60 ФИАН в неоднородном магнитном поле.

В первом параграфе описаны экспериментальные установки, на которых проводились эксперименты по измерению поляризационных характеристик СИ в неоднородном магнитном поле (рис.1а), а также исследования динамики поперечного сечения электронного сгустка в процессе ускорения (рис.1б). Описаны основные оптические элементы установки и системы детектирования, отмечены некоторые методические особенности проведения экспериментов. При проведении экспериментов особое внимание уделялось следующему аспекту: вакуумная система ускорителя имеет масляные диффузионные насосы и если не принять специальных мер, пары масла под действием фотонов СИ высокой энергии осадут

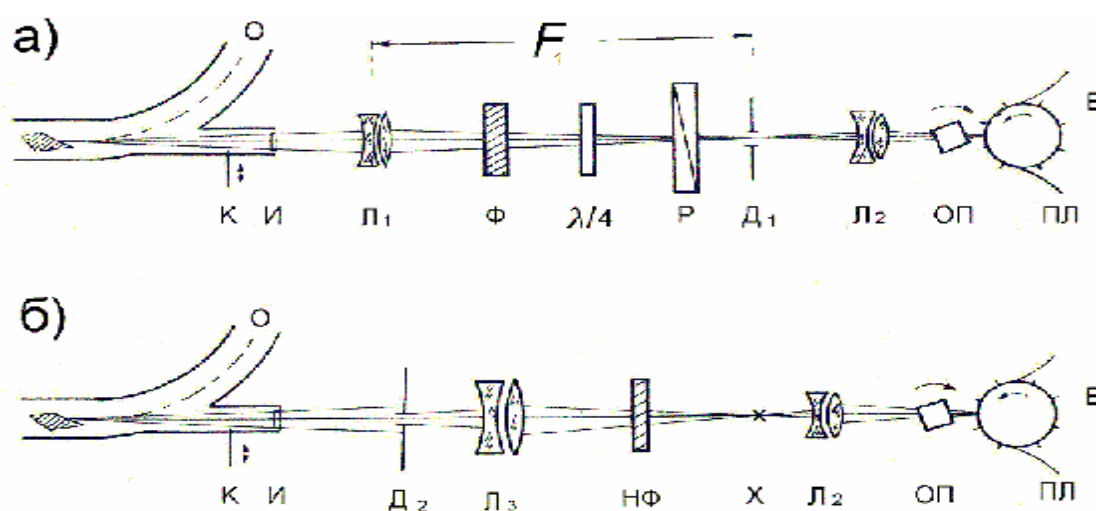


Рис.1. (а) - оптическая схема установки для исследования поляризационных характеристик СИ и (б) - ее модификация для исследования динамики поперечного размера электронного пучка.

на иллюминатор (И), что может привести к искажению углового распределения и вращению плоскости поляризации излучения. Поэтому на время, не занятое измерениями, иллюминатор защищался специальным вакуумно-оптическим затвором (К).

Существенной деталью методики эксперимента по измерению поляризационных характеристик СИ является независимость результатов от начального угла установки поляризатора (Р). Данное обстоятельство чрезвычайно важно с точки зрения процедуры измерений. В самом деле, весьма сложно осуществить точную ориентацию поляризатора относительно направления магнитного поля в секторе поворотного магнита в точке генерации наблюдаемого излучения. Истинное направление магнитного поля может быть найдено только с помощью магнитометрических измерений. Точность эксперимента зависит только от точности последовательных ориентаций поляризатора при измерении угловых распределений компонент поляризации СИ. Для подтверждения этого были проведены две серии измерений: при начальном угле ориентации поляризатора $\alpha_0 = 0^\circ$ к вертикали и для произвольно выбранного начального угла $\alpha_0 = +13^\circ$.

Во втором параграфе приведены основные экспериментальные данные по измерению зависимости поляризационных характеристик СИ от амплитуд аксиальных бетатронных колебаний электронов. Исследования проводились на синхротроне С-60, работающем в стандартном режиме, для диапазона энергий электронов 200 – 600 Мэв. При этом амплитуда аксиальных бетатронных колебаний электронов изменялась от 4,9 до 0,6 мм. Эти значения определялись по измерениям дисперсии нормального распределения частиц в сечении электронного пучка фотометрическим способом. В этом же диапазоне энергий (амплитуд бетатронных колебаний) на длине волны 476 нм для различных углов наблюдения и начальных углов ориентации поляризатора измерялись параметры Стокса, степени линейной, циркулярной и полной поляризации СИ.

Результаты измерений приведены на рис.1 и рис.2. Можно констатировать качественное согласие экспериментальных результатов с поведением теоретических кривых. Очевидно, что приведенные кривые правильно описывают наблюдаемое в эксперименте отклонение степени поляризации от прямой $P = 1$ в однородном поле. С другой стороны, наблюдается дополнительная деполяризация излучения, особенно сильная при больших амплитудах колебаний (при энергиях 200 – 300 Мэв). Данное отклонение может объясняться несколькими причинами, в числе которых, могут быть различные погрешности эксперимента – искажающее влияние оптической системы, остаточная масляная пленка на выводном окне

вакуумной камеры ускорителя и т.д. К возможным отклонениям теоретических и экспериментальных результатов следует, по-видимому, также отнести отличие

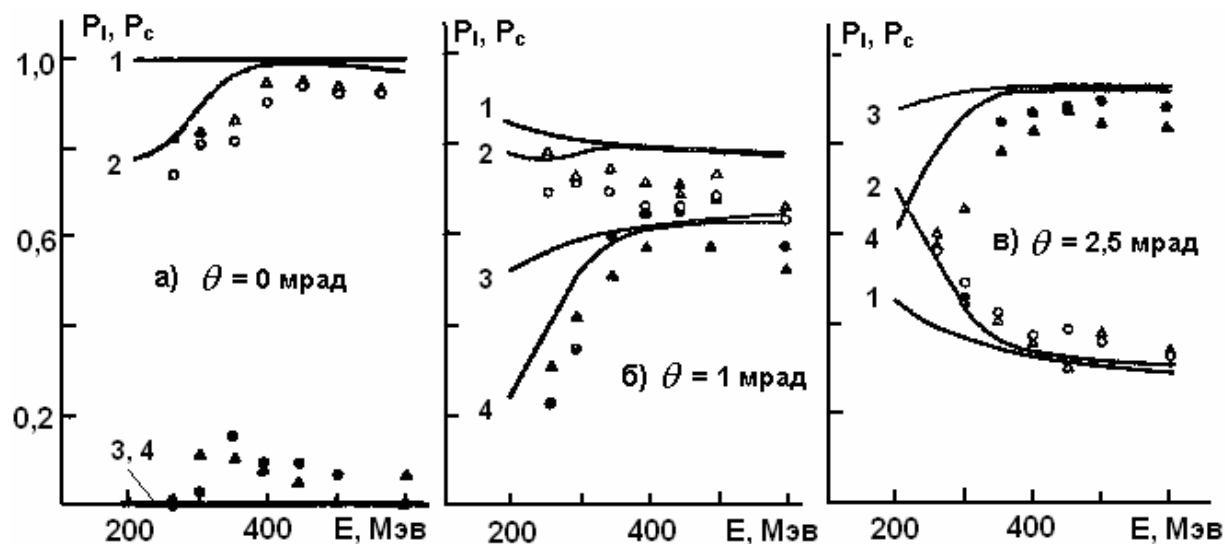


Рис.1. Динамика степени линейной (P_l) и циркулярной (P_c) поляризаций СИ для трех значений угла q в зависимости от энергии E : 1 - P_l , однородное магнитное поле (ОП), $\sigma_y = 0$; 2 - P_l , неоднородное магнитное поле (НП); 3 - P_c (ОП); 4 - P_c (НП); $\circ$ - P_l ($\alpha \approx 0^\circ$); Δ - P_l ($\alpha \approx 22,5^\circ$); $\bullet$ - P_c ($\alpha \approx 0^\circ$); $\blacktriangle$ - P_c ($\alpha \approx 22,5^\circ$).

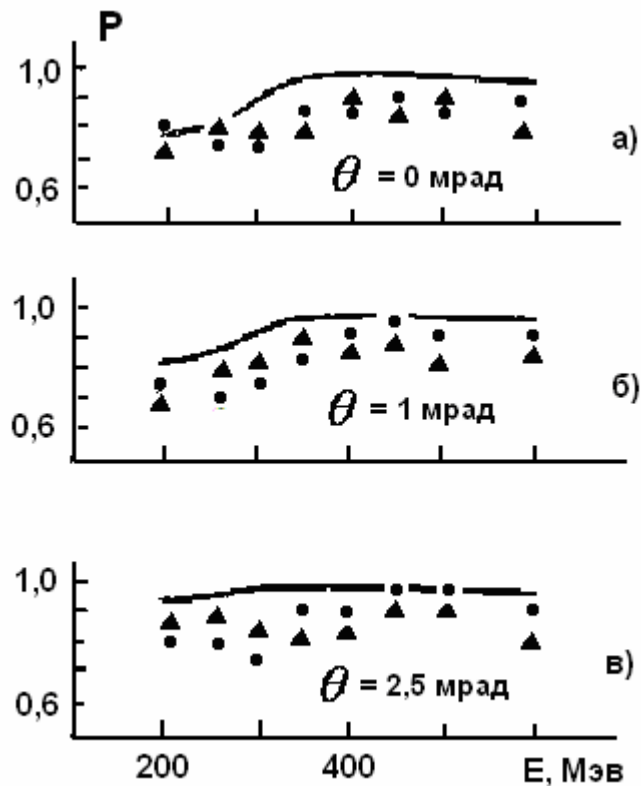


Рис.2. Динамика полной степени поляризации СИ; $\bullet$ - $\alpha \approx 0^\circ$; $\blacktriangle$ - $\alpha \approx 22,5^\circ$.

закона, по которому происходят реальные бетатронные колебания, от простого гармонического. Ангармонизм бетатронных колебаний связан с конструктивными особенностями синхротрона, а именно, с наличием прямолинейных промежутков, и должен являться предметом самостоятельного исследования.

В параграфе три описана сущность метода магнитной коррекции степени поляризации излучения, которая заключается в подавлении аксиальных бетатронных колебаний электронов путем вариации магнитного поля ускорителя. В момент достижения электронами определенной энергии в обмотки коррекции медианной магнитной поверхности и показателя спада магнитного поля подавались одновременно корректирующие импульсы тока длительностью порядка 400 мс. Ускоритель работал в режиме с «плато» в магнитном поле, величина которого соответствовала энергии электронов 570 МэВ и длительность которого составляла 500 мс. В результате осуществлялось значительное уменьшение амплитуды аксиальных бетатронных колебаний электронов (с 1,22 мм до 0,50 мм) и достигалось сжатие электронного сгустка почти в 2,5 раза в вертикальной плоскости при заметном (в 1,2 раза) сжатии в плоскости орбиты.

В четвертом параграфе приведено сравнение экспериментальных и теоретических данных для угловых распределений интенсивностей компонент поляризации, приведенных параметров Стокса и степеней линейной, циркулярной и полной поляризации СИ для различных начальных углов ориентации поляризатора, а также для стандартного режима работы ускорителя и режима коррекции. Отмечено хорошее совпадение экспериментальных и теоретических данных, полученных с учетом влияния аксиальных бетатронных колебаний на поляризационные характеристики СИ, как в отсутствие корректирующих импульсов, так и в режиме коррекции. Таким образом, полностью подтверждена теория, объясняющая деполяризацию СИ наличием аксиальных бетатронных колебаний ускоряемых электронов. Как следует из рис.3, в результате магнитной коррекции степень поляризации СИ в среднем увеличена с 81% до 98%, что подтверждает высокую эффективность предложенного метода коррекции. В частности, в плоскости равновесной орбиты электронов степень линейной поляризации СИ повышена с 82% до 99%. Таким образом, в этой плоскости СИ практически полностью линейно поляризовано. Теоретические кривые 1

(стандартный режим работы ускорителя) и 2 (режим коррекции) на рис.3 рассчитаны с учетом аксиальных бетатронных колебаний электронов, кривая 3 – для однородного магнитного поля.

Интересным результатом является предсказанное ранее теоретически и экспериментально подтвержденное в данной работе наличие двух минимумов в угловом распределении степени поляризации СИ (см. кривые 1 и 2 на рис.3), расположенных симметрично относительно плоскости равновесной орбиты электронов. Следовательно, максимальная деполяризация излучения имеет место не в плоскости орбиты, как считалось ранее, а в направлении некоторого угла q_c . Качественный расчет показывает, что величина этого угла обусловлена значениями амплитуд аксиальных бетатронных колебаний и, вероятно, соответствует моментам прохождения электронов через равновесное положение, в котором поперечная составляющая скорости достигает своего максимума.

Основные выводы работы, посвященной исследованию поляризационных характеристик СИ синхротрона С-60 ФИАН и возможности их коррекции, приведены в пятом параграфе. Здесь отмечено, что впервые для описания

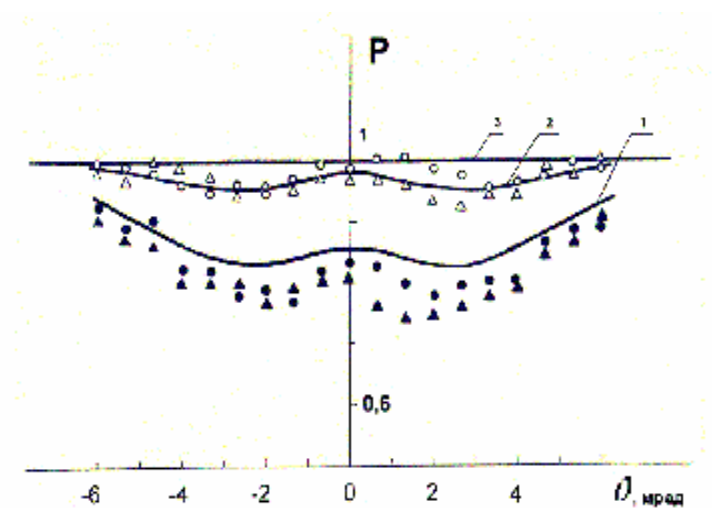


Рис. 3. Угловое распределение полной степени поляризации СИ.

Экспериментальные данные:

- - в стандартном режиме для $\alpha = 0^\circ$, ▲ - в стандартном режиме для $\alpha = +13^\circ$,
○ – в режиме коррекции $\alpha = 0^\circ$, Δ - в режиме коррекции для $\alpha = +13^\circ$.

поляризации СИ был использован метод параметров Стокса, адекватно отражающий все важнейшие характеристики эллиптической поляризации. Получены формулы для угловых распределений приведенных параметров Стокса СИ в неоднородном магнитном поле, выражения для линейной, циркулярной и полной степеней поляризации.

Экспериментальные данные находятся в соответствии с теоретическими кривыми, рассчитанными по формулам, учитывающим аксиальные бетатронные колебания электронов. Показано, что методом вариации магнитного поля возможно значительно увеличить степень поляризации СИ, что дает возможность получить источник практически полностью поляризованного излучения в широком спектральном диапазоне.

Третья глава посвящена теории затухания анизотропии флуоресценции.

В первом параграфе рассмотрено явление фотоотбора (селективного возбуждения частично ориентированного набора флуорофоров), имеющее место при возбуждении флуорофоров линейно поляризованным светом. В результате этого явления испускание флуорофора частично поляризовано. Анизотропия флуоресценции определяется через компоненты линейной поляризации согласно следующему выражению:

$$r = \frac{I_h - I_v}{I_h + 2I_v} = \frac{I_h - I_v}{I_0}, \quad (5)$$

где I_0 - полная интенсивность флуоресценции I_h и I_v - интенсивности, полученные при прохождении света через поляризаторы, ориентированные параллельно и перпендикулярно плоскости поляризации возбуждающего излучения соответственно. Показано, что величина анизотропии является мерой среднего значения $\cos^2 q$, где q - угол ориентации диполя возбужденной молекулы по отношению к оси, вдоль которой поляризовано возбуждающее излучение. Надежные измерения затухания анизотропии флуоресценции возможны только в том случае, когда времена вращательной корреляции находятся в диапазоне $0,1\tau < \phi < 10\tau$, где τ - время затухания интенсивности флуоресценции. Максимальное

значение анизотропии флуоресценции равно 0,4 и соответствует случаю изотропного раствора, когда диполи поглощения и испускания флуорофора параллельны и нет процессов, приводящих к деполяризации. Минимальное значение анизотропии равно -0,2 и имеет место в случае, когда диполи возбуждения и испускания перпендикулярны друг другу. Полное исчезновение анизотропии имеет место при так называемом “магическом угле” $q = 54,7^0$.

Во втором параграфе более подробно рассмотрены вопросы деполяризации флуоресценции. Отмечено, что одним из основных факторов деполяризации флуоресценции является вращательная диффузия молекулы флуорофора. Приведены выражения для затухания анизотропии флуоресценции сферической молекулы флуорофора в случае ее изотропного вращения, а также для сложных молекул, имеющих различные скорости вращения относительно различных осей. Кроме того, рассмотрены случаи затухания анизотропии флуоресценции для изотропно вращающихся молекул, находящихся в анизотропном окружении, при котором угловой диапазон вращательного движения ограничен. В заключение параграфа рассмотрен случай сегментальной подвижности молекулы флуорофора в предположении, что движение части макромолекулы происходит независимо от вращения молекулы в целом.

В четвертой главе рассмотрены различные применения метода измерения параметров затухания анизотропии флуоресценции в исследованиях биологических систем. Метод затухания анизотропии флуоресценции позволяет получать уникальную информацию об их молекулярной динамике, микровязкости, вращательной диффузии, сегментальной подвижности, вращении групп и т.д. Потенциальные применения метода включают исследования на молекулярном уровне текучести и жесткости мембран, локальной микровязкости в жидкостях и полимерах, протеин-протеиновые взаимодействия.

В первом параграфе дан обзор работ, посвященных исследованиям биологических мембран и липопротеинов с использованием метода измерения параметров затухания анизотропии флуоресценции. Рассмотрен ряд работ посвященных исследованию мембран с применением зонда 1,6-дифенил-1,3,5-гексатриен (DPH), в результате которых удалось определить их специфическую

пространственную структуру. В частности исследования тилакоидных мембран показали, что большие плоские области этих мембран соединены между собой сильно искривленными частями. Метод измерения затухания анизотропии широко используется и в исследованиях адаптации мембран к изменению температуры и гидростатического давления, в исследованиях структуры и динамики мембран, локальной микровязкости липосом, клеточных мембран и целых клеток. Метод хорошо зарекомендовал себя в изучении фосфатидилхолинов – наиболее трудно исследуемых фосфолипидов, входящим в состав большинства биологических мембран. В ряде работ проведены исследования вращательного и трансляционного движения триптофановых остатков в торопине S^* с применением метода измерения затухания анизотропии флуоресценции.

Метод измерения затухания анизотропии флуоресценции успешно был применен в исследованиях влияния этанола на текучесть биологических мембран. Было выявлено разжижающее (“флюидизирующее”) действие этанола на полярную и гидрофобную части мембран клеток печени крыс. Известно, что текучесть мембран во многом определяется степенью ненасыщенности жирнокислотных остатков в молекулах фосфолипидов и содержанием холестерина. Это позволяет рассматривать увеличение содержания холестерина и уменьшение количества ненасыщенных жирных кислот в мембранах при воздействии алкоголя как один из адаптивных механизмов, позволяющих повысить толерантность мембран к “флюидизирующему” действию этанола. В результате этого воздействия меняется жидкокристаллическое состояние мембран, в которых возрастает подвижность молекул липидов и белков. Разжижающее действие этанола на мембраны объясняется его внедрением в поверхность мембран между полярными группами фосфолипидов. Установлено, что при длительном воздействии этанола в мембранах клеток происходит уменьшение степени ненасыщенности липидов, увеличение содержания холестерина. Эти физико-химические процессы позволяют компенсировать “флюидизирующее” действие этанола.

Рассмотрены также работы, посвященные применению метода в исследованиях подвижности белков, а также изучению их взаимодействия с водой. Ряд работ посвящен исследованиям локальной динамики белков, что необходимо для понимания многих процессов, в частности, процесса свертывания.

Метод деполяризации анизотропии используется и в работах по исследованию сегментальной подвижности молекул. Взаимный поворот фрагментов возбужденного флуорофора сопровождается поворотом диполя молекулы. Поэтому это внутримолекулярное движение может быть зарегистрировано на фоне более медленной деполяризации флуоресценции за счет теплового вращения молекулы в целом. Эта особенность внутримолекулярной динамики широко используется в исследовании конформационной гибкости протеинов и других молекул.

Приведенный обзор литературы свидетельствует о широком использовании метода затухания анизотропии флуоресценции и доказывает актуальность внедрения этого метода в пучке синхротронного излучения для его использования в медицинских, биохимических и химических исследованиях.

Во втором параграфе описана экспериментальная установка, предназначенная для измерения параметров затухания интенсивности и анизотропии флуоресценции на ускорителе С-60 ФИАН, приведены ее основные технические характеристики. Оптическая схема установки приведена на рис.4. Установка обеспечивает исследование растворов объемом до 200 мкл. При этом диапазон длин волн возбуждающего излучения 200 – 1000 нм обеспечивается сменными дифракционными решетками, характеристики которых приведены в таблице 1.

Выделение компонент линейной поляризации флуоресценции осуществляется призмой Глана. Диапазон длин волн флуоресценции, при которых призма Глана осуществляет полное пространственное разделение выходных пучков с взаимно ортогональной поляризацией - 250 - 700 нм. Минимальное измеряемое на данной установке время затухания интенсивности флуоресценции составляет 0,5 нс и связано с конечной длительностью возбуждающего импульса СИ (7 нс) и его временной стабильностью, а максимальное время затухания определяется периодом повторения возбуждающих импульсов СИ и составляет 50 нс. Описаны основные принципы юстировки оптических элементов установки и измерения кривых затухания.

Одним из основных требований при создании станции была возможность работы с малыми количествами исследуемых веществ. Это потребовало

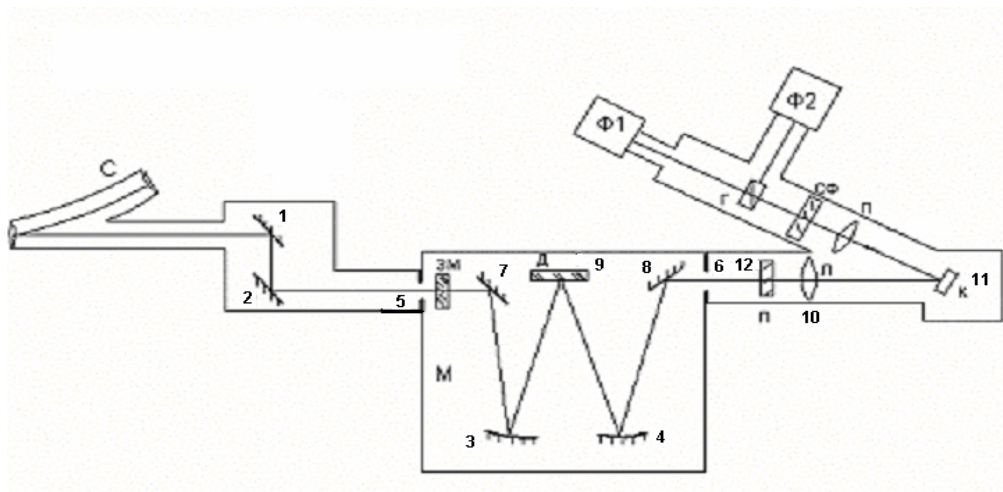


Рис.4. Схема экспериментальной установки.

С – камера ускорителя, ЗМ – затвор монохроматора, Д – дифракционная решетка, П – поляроид, Л – линзы, К – кювета, СФ – светофильтр, Г – призма Глана, Ф 1, 2 – ФЭУ.

№	Число штрихов/мм	Рабочая область, нм	Область максимальной концентрация энергии, нм	Обратная линейная дисперсия, нм/мм	Рабочий порядок
1	1200	200-500	250	1,3	Первый
2	1200	350-1000	500	1,3	Первый

Таблица 1. Характеристики сменных решеток монохроматора МДР-23.

разработку оригинального метода детектирования флуоресценции, характерной особенностью которого является регистрация флуоресценции с передней грани кюветы, в отличие от общепринятой схемы, в которой регистрация осуществляется с боковой грани. Угол падения возбуждающего излучения на кювету составляет 40° , а наблюдение ведется в вертикальной плоскости нормально к поверхности выходной грани кюветы, что необходимо для сохранения соотношения между компонентами линейной поляризации флуоресценции при ее прохождении через грань. Перед изготовлением кюветы были проведенные тестовые измерения спектра собственной флуоресценции кварцевых пластины, из которых эту кювету

предполагалось изготовить. Полученные данные показали, что в диапазоне длин волн 250 – 700 нм кварцевые пластины не обладают заметной флуоресценцией. Данному аспекту уделялось особое внимание, так как в противном случае необходимо было учитывать собственную флуоресценцию кюветы в измерениях затухания интенсивности флуоресценции образцов.

Для измерения времен затухания интенсивности и параметров затухания анизотропии флуоресценции используется метод счета фотонов, являющийся одним из наиболее чувствительных методов. Приведена блок-схема системы счета фотонов, которая осуществляет измерение распределения во времени одиночных фотонов флуоресценции двух взаимно перпендикулярных компонент линейной поляризации, соответствующих одиночному импульсу возбуждения. Измерение времени затухания компонент поляризации флуоресценции осуществляется с помощью двух 2048-канальных время-цифровых преобразователей. Временной интервал, соответствующий одному каналу равен 0,05 нс. Максимальная скорость счета фотонов регистрирующей системой ограничена величиной 10^4 имп/сек. Это ограничение объясняется следующими причинами:

1. Для правильной регистрации временного распределения фотонов флуоресценции необходимо, чтобы каждому возбуждающему импульсу соответствовало не более одного зарегистрированного ФЭУ фотона. В противном случае все фотоны, соответствующие одиночному импульсу возбуждающего света, будут зарегистрированы как один. Потеря последующих фотонов приведет к искажению временного распределения за счет искусственного увеличения малых времен и закон затухания искусственно сдвинется в сторону коротких времен. Это происходит потому, что система, из-за «мертвого» времени время-цифрового преобразователя, регистрирует только первый из пришедших фотонов флуоресценции.

2. Увеличение скорости свыше счета 10^4 имп/сек нежелательно из-за роста числа просчетов, т.к. «мертвое» время время-цифрового преобразователя составляет порядка 100 мкс. Оптимальная величина скорости счета регулируется путем изменения ширины выходной щели монохроматора.

Количество фотонов с горизонтальной поляризацией и длиной волны 500 нм в спектральном интервале 1 нм, падающих на образец, составляет 10^9 фот/с.

В третьем параграфе описана методика измерения затухания анизотропии флуоресценции. Проведено сравнение двух методов регистрации затухания анизотропии: однолучевой (L- формат) и двухлучевой (Т- формат). Обоснован выбор однолучевого метода регистрации для данной установки. Описана процедура калибровки чувствительности канала регистрации в двух положениях. Такая калибровка производилась с помощью двух зондов растворенных в этаноле: МБА (3-метоксибензантрон) ($t_0 = 13 \text{ нс}$, $I_{\text{воз}} = 340 \text{ нм}$, $I_{\text{фл}} = 420 \text{ нм}$) и пирена ($t_0 = 26 \text{ нс}$, $I_{\text{воз}} = 400 \text{ нм}$, $I_{\text{фл}} = 500 \text{ нм}$). Быстрое вращение указанных флуорофоров приводит к полной потере первоначальной ориентации за время жизни возбужденного состояния и к полной потере поляризации флуоресценции, что дает возможность определить относительную чувствительность канала регистрации флуоресценции в двух положениях, соответствующих измерению двух взаимно перпендикулярных компонент линейной поляризации флуоресценции.

Четвертый параграф посвящен вопросам обработки полученных экспериментальных данных. Значения параметров затухания анизотропии флуоресценции рассчитываются методом наименьших квадратов в два этапа. На первом этапе определяются параметры затухания интенсивности флуоресценции в предположении, что это затухание происходит по закону: $I(t) = I_1 e^{-t/t_1} + I_2 e^{-t/t_2} + I_3$, где величина I_3 описывает рассеянный свет. На втором этапе из измеренных кривых $I_h(t)$ и $I_v(t)$ определяется функция $D(t) = I_h(t) - I_v(t)$, из которой рассчитываются параметры затухания анизотропии флуоресценции $r(t) = r_1 e^{-t/j_1} + r_2 e^{-t/j_2} + r_3$ с учетом известных I_1 , I_2 , I_3 , t_1 и t_2 .

В пятой главе приведены экспериментальные данные, полученные на установке и подтверждающие ее работоспособность. Были проведены измерения параметров затухания интенсивности и анизотропии флуоресценции ряда образцов. В частности, были измерены параметры затухания интенсивности и анизотропии флуоресценции наиболее часто используемого в подобных экспериментах зонда 1,6-дифенил-1,3,5-гексатриен (DPH) в глицерине последовательно двумя каналами регистрации. Полученные результаты приведены в таблице 2 и находятся в

хорошем согласии друг с другом и данными, полученными из литературы, что подтверждает их надежность и работоспособность установки.

Сегментальная подвижность флуорофоров исследовалась на примере конформационного анализа нейтральной и заряженной молекул из серии 2(3'-пиридил)оксазолов. Исследуемые объекты принадлежат к ряду гетероциклических органических соединений, характеризующихся собственной флуоресценцией. Была поставлена цель исследовать структурную релаксацию (взаимный поворот фрагментов флуорофора) катиона в возбужденном электронном состоянии.

Канал	t , нс	r_o	j , нс
1	$10,2 \pm 0,5$	$0,39 \pm 0,03$	$11,1 \pm 0,9$
2	$9,8 \pm 0,4$	$0,40 \pm 0,04$	$10,4 \pm 0,8$
Литературные данные	10,5	0,37	9,8

Таблица 2. Параметры флуоресценции зонда DPH в глицерине.

Измерения стационарной и разрешенной во времени анизотропии флуоресценции проводились для нейтральной молекулы 3-(5-фенил-оксазол-2-ил)пиридин (соединение 1) и заряженного катиона 1-этил-3-(5-фенил-оксазол-2-ил)-пиридиниум; толуен-4-сульфонат (соединение 1a) в глицерине. Расчеты зависимости энергии образования указанных соединений от углов скручивания пиридинильных фрагментов молекул показали, что для обоих соединений в основном состоянии наиболее устойчивыми являются плоские молекулы. В возбужденном состоянии преимущественная конфигурация нейтральной молекулы продолжает оставаться плоской, для катиона же она переходит в скрученную под углом около 90° конфигурацию. Кинетика деполяризации флуоресценции нейтральной молекулы содержит два времени релаксации: $j_1 = 2,6 \text{ нс}$, $j_2 = 1,7 \text{ нс}$. Кинетика деполяризации флуоресценции катиона содержит кроме двух времен релаксации близких по значению к соответствующим временам нейтральной молекулы и быструю компоненту (порядка 0,5 нс), наблюдаемую в первые 1,5 – 2,2 нс после

возбуждения, которая может отражать изменение конформации молекул, т.е. поворот фрагмента: $j_1 = 0,55 \text{ нс}$, $j_2 = 5,67 \text{ нс}$, $j_3 = 3,1 \text{ нс}$. Угол поворота диполя, рассчитанный из данных затухания анизотропии флуоресценции, составляет 40° , что согласно расчетам на основе квантовой химии, выполненным сотрудниками химического факультета МГУ, соответствует углу поворота фрагмента равному 88° , что находится в хорошем согласии с величиной 90° . Приведенные данные подтверждают возможность использования установки для исследования фрагментарных вращений молекул.

Основные выводы

Проведено теоретическое и экспериментальное исследование влияния аксиальных бетатронных колебаний электронов в слабофокусирующем неоднородном магнитном поле на поляризационные характеристики СИ.

Для описания поляризационных свойств СИ впервые применен метод параметров Стокса, адекватно описывающий все основные характеристики эллиптически поляризованного излучения. Получены формулы, описывающие угловые распределения приведенных параметров Стокса СИ, а также выражения для линейной, циркулярной и полной степеней поляризации, учитывающие влияние аксиальных бетатронных колебаний электронов.

Приведены впервые полученные экспериментальные результаты измерений угловых распределений приведенных параметров Стокса СИ, линейной, циркулярной и полной степеней поляризации. Указанные данные находятся в хорошем согласии с теоретическими расчетами.

Создана экспериментальная установка, учитывающая поляризационные характеристики ускорителя С-60 ФИАН, предназначенная для измерения параметров затухания интенсивности и анизотропии флуоресценции биологических структур и молекул, находящихся в растворе. Приведены экспериментальные данные тестовых измерений затухания интенсивности и анизотропии флуоресценции, подтверждающие работоспособность установки.

Основные результаты диссертации изложены в следующих работах:

1. Г.В.Демьянов, В.А.Орлов, А.В.Титов, К.Н.Шорин, А.С.Яров, Поляризация синхротронного излучения в неоднородном магнитном поля, Краткие сообщения по физике, ФИАН, 1988, 1, 21.
2. G.V.Demyanov, N.K.Kurek, E.N.Lapshin, T.I.Syrejshchikova, M.N. Yakimenko, Protein fluorescence decay of human serum VLDL exposed to synchrotron radiation, Nucl.Instrum. And Meth., Phys. Res., Sect.A 308 (1991) 215-218.
3. Г.В.Демьянов, С.И.Исакова, Н.К.Курек, Е.Н.Лапшин, А.Н.Рухтин, Т.И.Сырейщикова, М.Н.Якименко, Исследование кинетики затухания флуоресценции липидного зонда в липопротеинах крови человека при возбуждении синхротронным излучением, Тезисы Международной конференции по люминесценции, Москва, 1994.
4. А.В.Акимов, Г.В.Демьянов, Н.К.Курек, С.С.Молчанов, Г.С.Пашенко, Т.И.Сырейщикова, Р.В.Федорчук, М.Н.Якименко, Установка для исследования кинетики затухания интенсивности и анизотропии флуоресценции биологических объектов, Тезисы Международной конференции по люминесценции, Москва, 1994.
5. A.V.Akimov, G.V.Demjanov, N.K.Kurek, S.S.Molchanov, G.S.Pashhenko, T.I.Syrejshchikova, R.V.Fedorchuk, M.N.Yakimenko, Station for the investigation of the decay kinetics of the fluorescence anisopropy of biological objects, Nucl. Ins. And Meth., Phys. Res., Sect.A 359 (1995) 345-347.
6. А.В.Акимов, Г.В.Демьянов, Н.К.Курек, С.С.Молчанов, Г.С.Пашенко, Т.И.Сырейщикова, Р.В.Федорчук, М.Н.Якименко, Установка для исследования кинетики затухания анизотропии флуоресценции биологических объектов, Оптика и спектроскопия, 1995, 78,2, 254-256.
7. G.V.Demyanov, M.Yu. Zabazarnych, S.I.Isakova, N.K.Kurek, E.N.Lapshin, T.I.Syrejshchikova, M.N.Yakimenko, Characteristic of molecular fluorescence of a lipid probe in human blood lipoproteins exposed to synchrotron radiation, Nucl. Ins. And Meth., Phys. Res., Sect.A 359 (1995) 342-344.
8. G.V.Demyanov, S.I.Isakova, N.K. Kurek, T.I.Syrejshchikova, M.N.Yakimenko, The measurements of the fluorescence anisotropy decay of the lipid probe

- in the liposomes, Bulletin of the Lebelev Physical Institute (Russian Academy of Science) N11-12(1995) 15-19.
9. Т.И.Сырейщикова, С.К.Гуларян, В.Ю.Светличный, Г.Е.Добрецов, С.И.Исакова, Г.В. Демьянов, Лейкоциты крови человека: исследование методом разрешенной во времени флуоресцентной спектроскопии, Материалы XIV Российской конференции по использованию синхротронного излучения, Новосибирск (2002) 29.
 10. В.В.Волчков, Г.В.Демьянов, М.В.Русалов, Т.И.Сырейщикова, Затухание анизотропии флуоресценции нейтрального и заряженного 2-(3'-пиридил)оксазола, Материалы XIV Российской конференции по использованию синхротронного излучения, Новосибирск (2002) 31.
 11. С.С.Алексеев, В.В.Волчков, Г.В.Демьянов, Т.И.Сырейщикова, Измерения затухания анизотропии флуоресценции в пучке синхротронного излучения, Труды третьей международной конференции молодых ученых и специалистов "Оптика-2003", под редакцией проф. С.А. Козлова, 250-251.
 12. А.Н.Литвинов, Г.В.Демьянов, Т.И.Сырейщикова, Г.Е.Добрецов, Использование метода разрешенного во времени резонансного переноса энергии между липофильными флуоресцентными зондами для исследования пространственной структуры биологических объектов, Труды третьей международной конференции молодых ученых и специалистов "Оптика-2003", под редакцией проф. С.А. Козлова, 290-291.
 13. В.В.Волочков, Г.В.Демьянов, М.В.Русаков, Т.И.Сырейщикова, Кинетика деполяризации флуоресценции нейтрального и заряженного 2-(3'-пиридил)оксазола, Журнал общей химии, 2005, 75, 6, 836.