

## ЭЛЛИПСОМЕТРИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ВИЧ. АВТОВОЛНЫ В ВИЧ-ТЕСТ-СИСТЕМАХ

И. Е. Скалецкая, Т. К. Крутицкая, В. Е. Холмогоров, А. В. Бармасов

*Санкт-Петербургский государственный университет информационных технологий,  
механики и оптики,  
Санкт-Петербургский государственный университет*

В прямом поляризационно-оптическом эксперименте установлено явление автоколебательной кинетики псевдо-клеточных элементов тест-системы контроля ВИЧ фирмы «Авиценна» вблизи диэлектрического экрана контролируемой оптической ячейки. При использовании типового эллипсометра серии ЛЭФ-3М со специализированной настройкой индикаторного сигнала гашения света  $U_{\text{ФЭУ}}$  впервые получены регистрограммы аномального поведения этого сигнала на поверхности оптической ячейки во времени, которые описывают реальные процессы взаимодействия элементов тест-системы с этим экраном в поле дисперсионных сил Ван-дер-Ваальса. Выполнены эллипсометрические наблюдения взаимодействия отдельных компонент ВИЧ-тест-системы с элементами оптической ячейки исследования кинетики гетерофазных реакций в поляризованном свете, в результате которых обнаружены колебательные процессы адгезии биополимеров системы. Обнаруженные эффекты интерпретируются как феномен Белоусова-Жаботинского в кинетике адсорбции молекул иммуноглобулинов тест-системы ВИЧ на измерительную ячейку в реакциях образования комплекса антиген-антитело.

### ВВЕДЕНИЕ

Наиболее непосредственную информацию о внутренней геометрии расположения молекул и атомов в квантовых точках дают рентгено- и электрографические методы.

Ценную информацию о микропараметрах подобных систем дают также методы определения дипольных моментов полярных связей и, в частности, эллипсометрия [1].

Более опосредованную ценную информацию получают методами спектроскопии [2]. Наиболее интересную спектромолекулярную информацию дают методы исследования химических сдвигов и констант спин-спинового взаимодействия, такие как ЭПР- и ЯМР-спектроскопии. Энергетические данные, кроме того, дают прямые термодинамические [3, 4] методы исследования материалов.

В комплексе хирально-оптических методов используются исследования дисперсии оптического вращения (ДОВ) и кругового дихроизма (КД), что совместно с классической поляриметрией позволяет уверенно различать энантиомеры молекул и их фрагментов, чувствительных к динамике изменения пространственных конфигураций в процессе эволюции внутренних взаимодействий.

В 1925 г. А. Лотка сформулировал гипотезу о колебательном характере ступенчатых реакций с

положительной обратной связью во внутреннем звене [5]:



Позднее реальность таких процессов была подтверждена экспериментально на примере протекающего в автоколебательном режиме каталитического окисления различных восстановителей бромноватой кислотой  $\text{HBrO}_3$ . В частности, наблюдалось изменение окраски раствора малоновой кислоты  $\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_4$  ионами  $\text{Ce}^{4+}$  (с частотой около 1 Гц), окисляемой смесью  $\text{KBrO}_3$  с  $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ . Реакцию открыл в 1951 г. Б.П. Белоусов, а подробно изучил в 1964 г. А.М. Жаботинский [6—9]. Этот эффект теперь называют реакцией Белоусова-Жаботинского.

В биохимии реакции подобного типа наблюдать сложнее, хотя биоритмика — широко известное явление. Существует предположение, что периодические химические реакции определяют существование в живых организмах биологических ритмов.

### РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТОВ С ТЕСТ-СИСТЕМОЙ НА ВИЧ

Эллипсометрия всегда относилась к наиболее прогрессивным нанотехнологическим методам оптического материаловедения благодаря оригинальной простой физической идее использования поляризованного когерентного света с эллиптичес-

© Скалецкая И. Е., Крутицкая Т. К., Холмогоров В. Е., Бармасов А. В., 2007

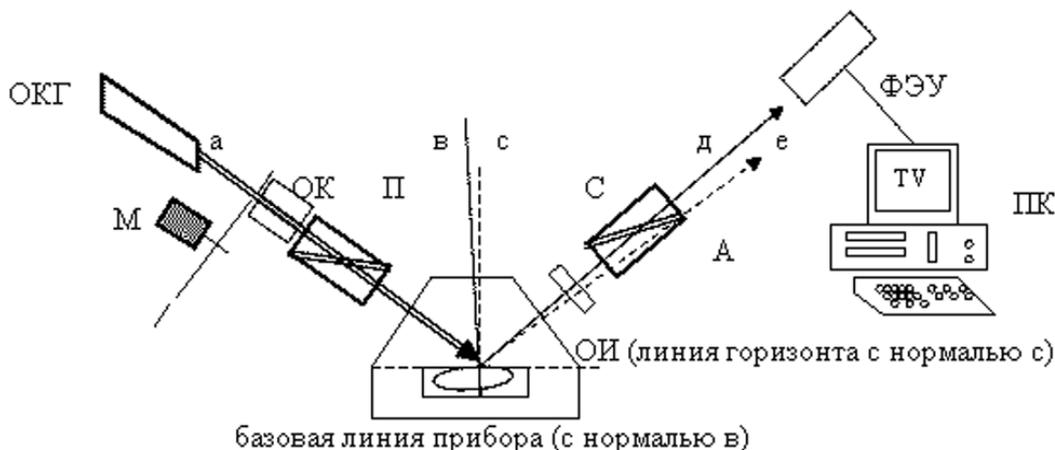


Рис. 1. Схема скрещенных поляризаторов (П×А) при косом падении света на ОИ: ОКГ — источник когерентного монохроматического излучения ( $\lambda = 632,8$  нм); М — низкочастотный модулятор-прерыватель светового пучка 1 мм апертуры; П, А — кристаллические поляризаторы Глана-Томсона; С — компенсатор ( $\lambda/4$ ); а, е — реальные лучи падения и отражения на строго горизонтальном участке ОИ; в — базовая линия симметрии между плечами падения (а) и регистрации (д) ФЭУ; ОИ — объект исследования (зеркальная поверхность объекта исследования); ОК — расположение возможного коллиматора тонких пучков

кой аппроксимацией его деполяризации после взаимодействия с объектом исследования (ОИ) при амплитудно-фазовом контроле поля отраженной (прошедшей) от ОИ световой волны.

Ее принципиальное преимущество перед энергетическими методами состоит в очень высокой чувствительности измерений этих амплитудно-фазовых  $\Psi(\theta) - \Delta(\theta)$  параметров поля световой волны после взаимодействия с ОИ при косом падении волны на ОИ ( $45^\circ < \theta < 90^\circ$ ) в широком интервале угловых измерений:  $0 < \Psi < 45^\circ$ ;  $0 < \Delta < 180^\circ$ .

В основе метода эллисометрии лежит теория бесконечнократной интерференции поляризованного света в средах их распространения безотносительно значений размеров их толщин между границами раздела фаз от атомномальных (идеальных границ Френеля) до макроразмеров плоскопараллельных планарных структур.

Физический принцип работы эллисометров базируется на классическом законе Малюса, описывающем энергетику света при его прохождении через систему скрещенных поляризаторов при косом падении на объект исследования когерентного излучения.

Теория эллисометрии восходит к решениям задач максвелловской электродинамики в краевой постановке для плоских волн, известная как граничные уравнения Френеля и удачно обобщенная Эри и Друде в виде основного уравнения эллисометрии (ОУЭ).

Эллисометрические параметры  $\Psi(\varphi) - \Delta(\varphi)$  при заданных  $\varphi = \theta_i = \theta_r$  (углах падения и отражения) и  $\lambda = 632,8$  нм (длине волны) являются характеристиками реальной физической поверхности ОИ и определяются природой вещества, из которого он состоит, структурой приповерхностного слоя, качеством обработки поверхности (высотой шероховатостей, структурными или энтропийными нарушениями, обусловленными полировкой, дефектами и т.д.), наличием на ней каких-либо пленок произвольной ( $d < \lambda$ ) толщины, а так же  $n_{out} - ik_{out}$  (оптическими константами) внешней среды, в которой находится образец.

Эти параметры  $\Psi - \Delta$  входят в ОУЭ вида [10]:

$$R = |R| \cdot e^{i\Delta} = F \cdot e^{i\Delta} = \text{tg} \psi \cdot e^{i\Delta} = R_p / R_s \quad (1)$$

и описываются обобщенными комплексными коэффициентами Френеля  $R(\theta, n, k, d/\lambda)$  для пла-

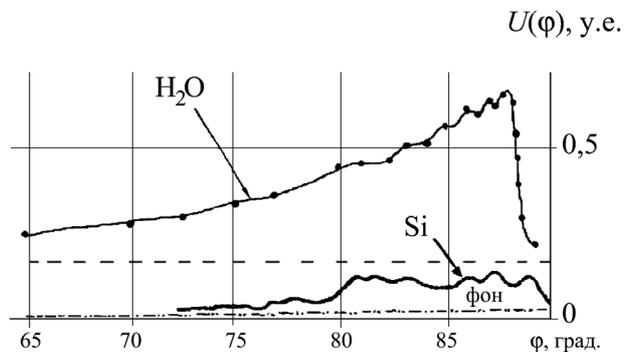


Рис. 2. Остаточная интенсивность  $U_{\text{ФЭУ}}$  гашения света в скрещенных поляризаторах

нарной ( $p$ ) и сагитальной ( $s$ ) компонент поля световой волны относительно плоскости ее падения на ОИ.

В качестве прецизионных приборов для определения кинетики протекания реакций использовались эллипсометры ручного управления серии ЛЭФ-2 и ЛЭФ-3М с автоматической записью аналогового сигнала настройки ФЭУ на полное гашение исследуемых растворов.

В традиционной эллипсометрии сигнал гашения  $U_{\text{ФЭУ}}$  в фоторегистрирующей системе прибора считается индикаторным сигналом. В то же время этот сигнал содержит важную дополнительную информацию, в частности, об энергетической кинетике  $U_{\text{ФЭУ}}(t)$  развития исследуемой системы. В общем случае этот сигнал несет количественную информацию о спектрах аномального отражения (АО) на скользящих углах падения ( $\varphi \rightarrow \pi/2$ ), аналогичного известному в рентгеновской оптике эффекту Ионеды [11].

Физический смысл угловой зависимости  $U_{\text{ФЭУ}}$  остаточного гашения поляризованного света в скрещенных поляризаторах чрезвычайно прост. Дело в том, что поле отраженной волны формируется всеми реальными механизмами взаимодействия света с веществом. Гашение света линейными поляризаторами (до фонового уровня  $U_{\text{фон}}$ ) действует на волны идеального френелевского отражения с эллиптической в общем случае поляризацией. Следовательно, все остальные лучи, формируемые механизмами объемного диффузного переизлучения и описываемые индикатрисами направленного рассеяния, естественно, и определяют эту остаточ-

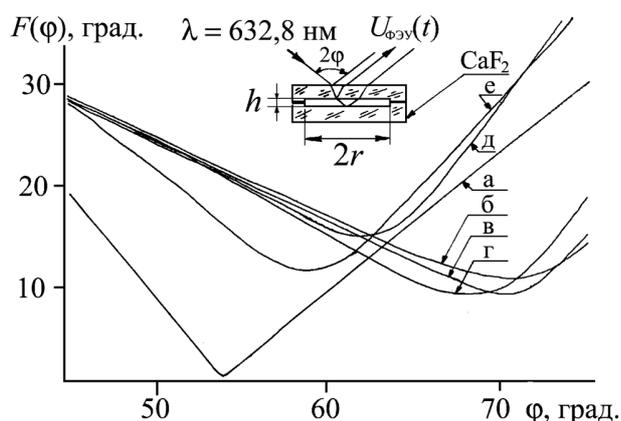


Рис. 3. Амплитудная функция  $F = \text{tg}(\Psi)$  при отражении от очень слабых растворов: на диэлектрике (кривая  $a$  — от верхней части оптической ячейки из  $\text{CaF}_2$ ); на физрастворе (кривая  $e$  — от верхней части кюветы и  $d$  — нижней); на растворах  $aB$  и  $aG$  сверху ( $e$  — от  $aB$ ,  $v$  — от  $aG$  и  $b$  — от смеси  $aB + aG$ )

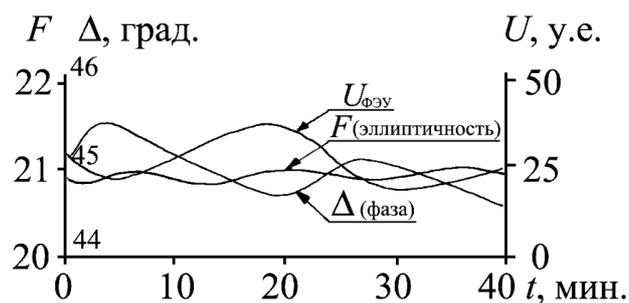


Рис. 4. Наблюдение размахов сигнала гашения  $U_{\text{ФЭУ}}(t)$  и  $\Psi - \Delta$  параметров при  $\varphi = 45^\circ$

ную интенсивность с характерным для эллипсометров профилем  $U_{\text{ФЭУ}}(\varphi)$  огибающей индикатрис на околос зеркальных углах отражения. В коротковолновой рентгенооптике лучи аномального отражения сдвинуты в сторону скользящих траекторий по сравнению с зеркальным отражением. В видимом диапазоне они перекрываются, но на скользящих углах при отражении от сильно диффузных ОИ зеркальные лучи теряются, а АО скачком может изменить угол своей пеленгации.

Проверка характеристик  $\Psi - \Delta$ , представленная на рис. 3 и 4, показала их типовой характер для кюветы из кубического кристалла  $\text{CaF}_2$  и испытуемых жидкостей на основе физиологических растворов поваренной соли. Из рис. 3 видно, что амплитудные функции имеют характерный минимум при углах псевдо-Брюстера, наиболее глубокий для чистого диэлектрика — кристалла  $\text{CaF}_2$  (в идеале равный 0) и характерными сдвигами в область больших углов для веществ с большим показателем преломления ( $n = \text{tg}\varphi_{\text{мин}}$ ).

В работе регистрировалась кинетика процессов, реально происходящих в тест-системах на СПИД фирмы «Авиценна».

Санкт-Петербургский филиал московской фирмы «Авиценна» успешно развивает оригинальную продукцию тест-систем на СПИД, в которой используются синтетические гаптены 160, 120, 41, HCV-core, NS4 с околочасовым временем диагностики.

Фирма внедряет также систему АВИЦЕНА-НСМУ СКРИН ТМ ПЦР, предназначенную для качественного выявления ДНК цитомегаловируса в плазме крови, цельной крови, моче, слюне и других тканях испытуемого с последующим анализом их на принадлежность группе риска методами эффективной полимеразной цепной реакции.

С целью исследования этой кинетики при всевозможных вирусологических атаках живых клеток была изготовлена герметизированная проточ-

ная кювета Ван-дер-Ваальса с электрооптическим доступом контроля и управления жизнедеятельностью клеток *in vitro*. Ее размеры ( $\pi r^2 h$  при  $r$  порядка 10÷15 мм) соизмеримы с клеточными форменными элементами биологических тканей. Ожидалось, что прохождение вируса через клетки в этой кювете могут сопровождаться химическими изменениями значения диэлектрической проницаемости  $\epsilon$  жидкостной системы клетки. Она, в свою очередь, должна непосредственно коррелировать с кинетикой изменения показателя преломления системы  $\epsilon = (n - ik)^2$ . Здесь компоненты комплексного показателя преломления характеризуют показатель преломления  $n$  (вещественная часть) и показатель экстинкции или светоослабления  $k$  (мнимая часть), который зависит как от поглощения  $\alpha = 4\pi k/\lambda$  вещества, так и от реального светорассеяния на его поверхности или в объеме. Показатели преломления и экстинкции обычно регистрируются с помощью эллисометров. Таким образом, предполагалось, что изменения показателя преломления будут отражать весь спектр иммуноферментных реакций РНК вируса по мере его продвижения в клетке.

На рис. 4 представлены кривые, объясняющие значительное увеличение погрешности эллисометрических измерений на концентрированных растворах  $aG + aB$  тест-системы от долей минуты ( $\pm 30''$ ) при стационарных измерениях азимутов поляризаторов на лимбах Свиташова в прецизионных эллисометрах ручного управления до долей градуса на ОИ.

Вариации во времени размахов измеряемых на опыте величин, представленных на рис. 4, оказались не погрешностями измерений, а кинетической разверткой процессов комплексообразования в тест-системе  $aG + aB = GB\text{-complex}(t)$ .

Более детальный и длительный (суточные измерения одного и того же раствора) анализ поведения основного ОИ (растворов  $aG + aB$ ) позволил

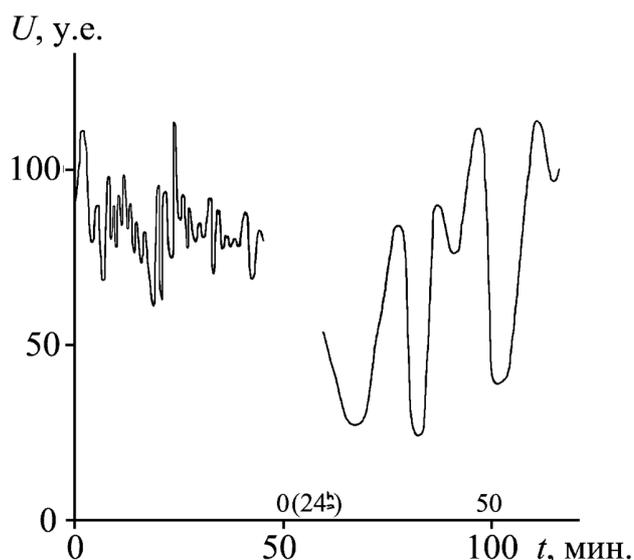


Рис. 5. Высоко- и низкочастотные компоненты сигнала  $U_{\text{ФЭУ}}(t)$  в растворе  $aG + aB$

установить автоволновые режимы в этой системе, представленные на рис. 5.

Представленные на рис. 5 данные длительных наблюдений говорят о самобытном характере поведения компонент реакции  $aG + aB = \text{complex}(t)$ , идентичного автоволновым процессам взаимодействия биополимеров (эффект Белоусова-Жаботинского). Высокочастотные компоненты спектра  $U_{\text{ФЭУ}}(t)$  здесь приходятся на околominутный диапазон, а низкочастотные — на порядок выше.

Наблюдения кинетического поведения компонент тест-системы под прозрачным отполированным окном оптической ячейки наблюдения позволили выявить детали аналогичных авторелаксационных феноменов на рис. 6 и 7.

Концентрированный солевой раствор козьего альбумина (белок-А) с момента ( $t = 0$ ) приведения его в контакт с оптической ячейкой наблюдения из  $\text{CaF}_2$ , согласно данным рис. 6, демонстрирует

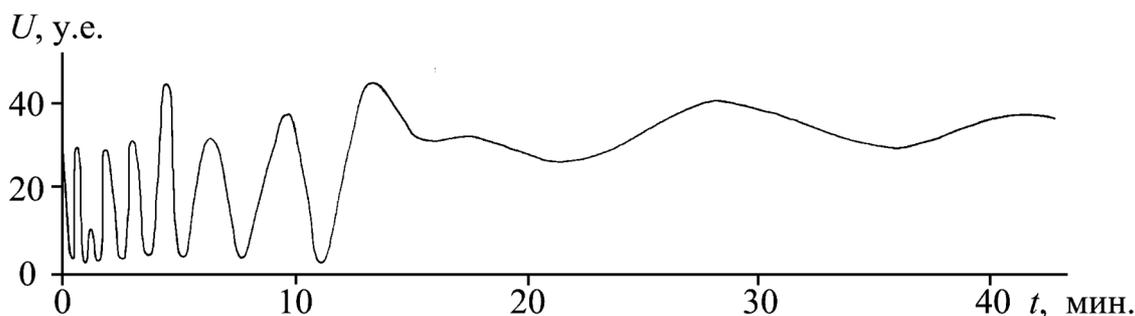


Рис. 6. Характерное поведение во времени  $aB$ -компонента ВИЧ-тест-системы

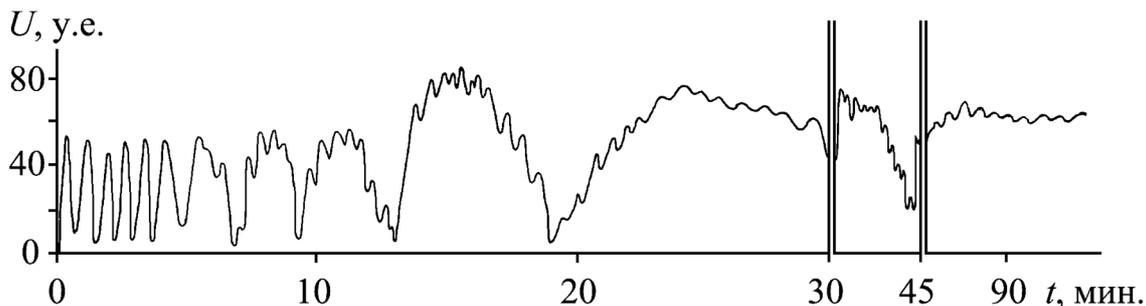


Рис. 7. Характерное поведение во времени  $aG$ -компонента ВИЧ-тест-системы

асимптотическое уменьшение амплитуды и частоты атак адгезии биополимеров с поверхностью диэлектрика, описывающие, по-видимому, наложение целыми блочными агрегатами и полным экранированием за околочасовой период.

Высокочастотные компоненты спектра  $U_{\text{ФЭУ}}(t)$  здесь, так же как и на рис. 5 приходится на околоминутный диапазон, а низкочастотные — на порядок больше.

Картина поведения во времени  $aG$ -компонента ВИЧ-тест-системы, представленная на рис. 7, выглядит сложнее адгезии белка-А. Здесь просматривается эстафетный механизм перехода высокочастотных интенсивных атак в более инерционные атаки целых блоков без асимптотического уменьшения амплитуды этих атак, но с заметным уменьшением амплитуд атак высокочастотных составляющих. Однако, в конце второго часа, адгезия, по-видимому, релаксационно устанавливается в приповерхностном слое этого ОИ.

Высокочастотные компоненты спектра  $U_{\text{ФЭУ}}(t)$  здесь почти удвоились по сравнению с процессами на рис. 5 и 6 (до полуминутного диапазона в блоках), а низкочастотные — прогрессивно падают.

### ИНТЕРПРЕТАЦИЯ КИНЕТИЧЕСКИХ ДАННЫХ

Поскольку реактивность сложных систем обычно равняется на быстроедействие наиболее медленных составляющих, постольку совместное поведение растворов  $aG$  и  $aB$  вблизи диэлектрического экрана логично происходит с околominутной ритмикой высокочастотных компонент, но без заметного затухания — авторелаксационно.

Фурье-анализ ведущей быстрой компоненты этой смеси растворов представлен на рис. 8 и 9. Данные на рис. 8 показывают кинетическое распределение во времени  $\delta U(t)$  энергетических амплитуд деполаризации светового сигнала в разбалансировке гашения  $U_{\text{ФЭУ}}(\tau)$  на периодах осцилля-

ции  $\tau(t) = t_{i+1}(U_{\text{min}}) - t_i(U_{\text{min}})$ , типичное для статистики Ферми-Дирака:

$$\delta U(t) = \frac{U_{\text{max}} - U_{\text{min}}}{e^{\frac{t-t_0}{\tau(t_0)}} + 1},$$

где  $\tau(t_0)$  — полуширина зоны перегиба в окрестности точки перегиба  $t_0$ . Характерное перевалочное время для  $aG$  составляет величину  $t_0 = 24$  мин при полуширине перевалочного периода  $\tau(t_0) = 2$  мин.

На рис. 9 представлены темпы прогрессивного нарастания периодов  $\tau(t) = t_{i+1}(U_{\text{min}}) - t_i(U_{\text{min}})$  глобу-

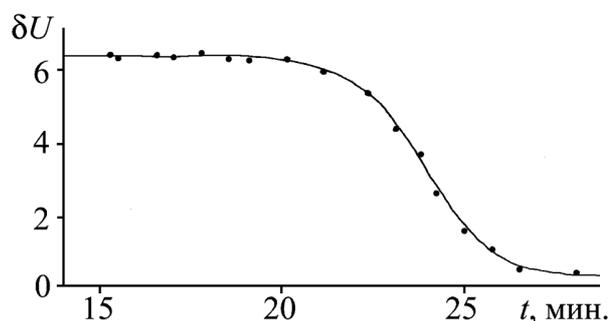


Рис. 8. Характер убывания амплитуды перепадов  $\delta U(t)$  аналогового сигнала  $U_{\text{ФЭУ}}(t)$

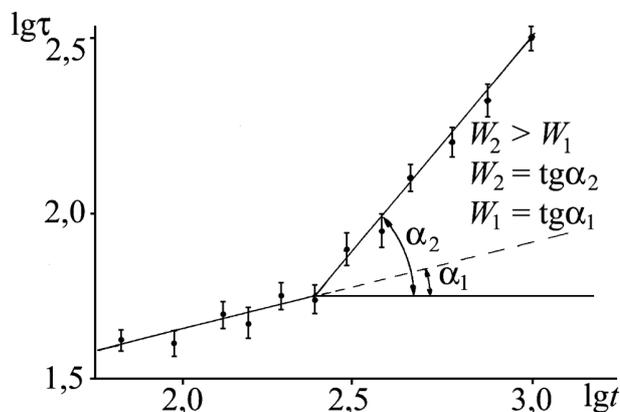


Рис. 9. Прогрессия нарастания темпов  $\tau(t) = t_{i+1}(U_{\text{min}}) - t_i(U_{\text{min}})$  осцилляции  $U_{\text{ФЭУ}}(t)$

лизации  $aG$  вблизи диэлектрического экрана наблюдения поляризационных осцилляций  $U_{\text{ФЭУ}}(t)$  его раствора в логарифмическом масштабе.

Из приведенных на рис. 9 данных видно, что поляризационная активность  $aG$  в растворе на границе с диэлектрическим экраном, действительно, состоит из двух этапов с переломом при переходе от высокочастотных к низкочастотным режимам релаксаций в точке  $t_0 = 24$  мин.

Рассмотрим теоретическое обоснование эффекта Белоусова-Жаботинского для этой иммуноферментной реакции.

Избыточное вещество ( $A$ ) задает реакцию нулевого порядка на первой ступени со скоростью  $k_0$  образования продукта ( $B$ ) с распадом на смесь  $BC$  со скоростью  $k_1$ . На второй ступени генерации продукта ( $C$ ) из смеси  $BC$  (со скоростью  $k_1$ ) наблюдается также и его деградация со скоростью  $k_2$ . На третьей ступени образуется конечный продукт цепочки ( $D$ ) из  $C$  с той же скоростью генерации  $k_2$ . Эти процессы можно описать системой:

$$\begin{cases} \frac{dB}{dt} = k_0 - k_1 BC \\ \frac{dC}{dt} = k_1 BC - k_2 C \\ \frac{dD}{dt} = k_2 C \end{cases} \quad (2)$$

Конечный продукт ( $D$ ) не входит в первые два уравнения системы (2), поэтому ее точки стационарности можно анализировать по частям, решая систему первых двух уравнений отдельно от третьего. Обращение скоростей образования  $B$  и  $C$  в ноль дает два алгебраических уравнения связи коэффициентов равновесных концентраций  $B_0$  и  $C_0$ :

$$\begin{cases} k_0 = k_1 B_0 C_0 \\ k_1 B_0 C_0 = k_2 C_0 \end{cases} \Rightarrow \begin{cases} C_0 = \frac{k_0}{k_2} \\ B_0 = \frac{k_2}{k_1} \end{cases} \quad (3)$$

Для анализа конфликтных механизмов нарушения устойчивости этих решений в (3) зададим малые ( $x, y$ ) вариации концентраций  $A(t) = A_0 + x(t)$  и  $B(t) = B_0 + y(t)$ . При подстановке этих форм в первые два уравнения системы (2) получаем новую систему с квадратично малым членом ( $xy \rightarrow 0$ ):

$$\begin{cases} \frac{dx}{dt} = -k_2 y - k_1 x y - \frac{k_1 k_0}{k_2} x \\ \frac{dy}{dt} = k_1 x y + \frac{k_1 k_0}{k_2} x \end{cases} \Rightarrow \begin{cases} \frac{dx}{dt} = -k_2 y - \frac{k_1 k_0}{k_2} x \\ \frac{dy}{dt} = + \frac{k_1 k_0}{k_2} x \end{cases} \quad (4)$$

Вводя обозначения  $\omega^2 \equiv k_1 k_0$  и  $2\delta \equiv \omega^2 / k_2$ , систему (4) можно записать одним уравнением второго порядка:

$$\frac{d^2 x}{dt^2} + 2\delta \frac{dx}{dt} + \omega^2 x = 0 \dots \Rightarrow \Rightarrow x(t) = e^{-\delta t} [c_1 \cos(\omega t) + c_2 \sin(\omega t)] \quad (5)$$

где параметры корней характеристического уравнения операторов ( $\lambda$ ) дифференцирования этого уравнения  $\lambda^2 + 2\delta\lambda + \omega^2 = 0$  ( $\lambda_{1,2} = -\delta \pm i\omega$  при  $\omega^2 = \omega_0^2 - \delta^2$  и  $i^2 = -1$ ), во-первых, определяют затухающий характер релаксационных решений (5) к устойчивому фокусу (3) при отличных от нуля положительных декрементах затухания  $\delta$  или, наоборот, к катастрофически неустойчивому фокусу ( $\infty$ ) при отрицательном декременте ( $\delta < 0$ ,  $e^{-\delta t} \rightarrow \infty$ ) и, во-вторых, объясняют гармонические устойчивые резонансные ( $\omega = \omega_0$ ) колебания при  $\delta = 0$ .

## ВЫВОДЫ

Методами эллисометрии НПВО при специальной настройке в приборах ручного управления сигнала гашения  $U_{\text{ФЭУ}}$  на стартовый минимум  $U_{\text{ФЭУ}} = U_{\text{фон}}$  удается проследить за релаксационной кинетикой взаимодействий в сложных биополимерных растворах  $aB + aG$  и в составляющих их оптически активных компонентах (физрастворах  $aB$  и  $aG$ ) вблизи диэлектрического экрана ячейки наблюдения.

По сравнению с релаксационными кривыми адгезии биополимеров к экрану ячейки наблюдения компонентов тест-системы на СПИД фирмы «Авиценна» реакция  $aB + aG = BG$  комплексообразования оказалась вопреки законам термодинамики растворов не релаксационного, а автоколебательного типа с характерными временами высоко- и низко- частотных составляющих, индуцированных компонентами этой комплементарной реакции взаимодействия  $aB$  и  $aG$ . По-видимому, энергетика этих взаимодействий выше адсорбционной к диэлектрическому экрану, а колебательный механизм предсказуем по частотному спектру компонент комплексообразующей системы.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Эллисометрическое определение сродства моноклональных антител к антигенам // J. Immunolog. methods. 1986. V. 52.
2. Никольский Б.Н., Скалецкий Е.К., Тулуб А.А. Определение констант ионного обмена по данным спектрофотометрии./ДАН СССР. 1979. Т. 274. № 1. С. 156—158.
3. Холмогоров В.Е., Крыленков В.А., Свистуненко Д.А. Фотоиндуцированные парамагнитные центры в

крови человека. В кн.: Физикохимические свойства водных систем / *Ред. М.Ф. Вукс, О.Ф. Безруков*. — СПб., 1991. — С. 141—163.

4. *Dadd A., Croft S.* A new UV/Visible spectrophotometer for method development and quality control in the pharmaceutical industry // *Science Tools from Pharmacia Biotech*. 1996. No. 1. P. 3.

5. *Lotka A.J.* Elements of physical biology. — Baltimore, 1925.

6. *Жаботинский А.М.* Колебательные химические реакции в гомогенной среде и смежные проблемы // В

сб.: «Колебательные процессы в биологических и химических системах». — М.: Наука, 1967. — 149 с.

7. *Жаботинский А.М.* Концентрационные автоколебания. — М.: Наука, 1974.

8. *Полак Л.С., Михайлов А.С.* Самоорганизация в неравновесных физико-химических системах. — М., 1983.

9. *Oscillations and traveling waves in chemical systems*. — N.-Y., 1985.

10. Основы эллипсометрии / *Под ред. А.В. Ржанова*. — Новосибирск, 1979. — 422 с.

11. *Yoneda Y.* Anomalous surface refraction of X-rays // *Phys. Rev.* 1963. V. 131. No. 5. P. 2010—2017.