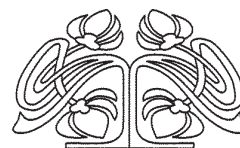




Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования  
«Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского»

# ИЗВЕСТИЯ

САРАТОВСКОГО  
УНИВЕРСИТЕТА  
Новая серия



Научный журнал  
2017 Том 17

ISSN 1817-3020 (Print)

ISSN 2542-193X (Online)

Издается с 2005 года

Серия Физика, выпуск 3

Продолжение «Известий Императорского Николаевского Университета» 1910–1918, «Ученых записок СГУ» 1923–1962,  
«Известий Саратовского университета. Новая серия» 2001–2004

## СОДЕРЖАНИЕ

### Научный отдел

#### Оптика и спектроскопия. Лазерная физика

**Хлебцов Б. Н., Пылаев Т. Е., Ханадеев В. А., Хлебцов Н. Г.** Применение спектроскопии поглощения и динамического рассеяния света в исследованиях систем золотых наночастиц + ДНК

136

#### Биофизика и медицинская физика

**Никитин С. Ю., Устинов В. Д., Цыбров Е. Г., Приезжев А. В.** Улучшенный алгоритм обработки данных для лазерной эктацитометрии эритроцитов

150

#### Беликов А. В., Скрипник А. В., Антропова М. М.

Численное моделирование методом Монте–Карло распространения лазерного излучения в многослойной среде, имитирующей ткани головы в норме и при внутричерепной гематоме

158

#### Сергеева И. А., Хитрина К. А., Крот А. Р., Сукнева А. В., Петрова Г. П.

Исследование взаимодействия и динамики молекул в растворах коллагена и коллагеназы методом динамического рассеяния света

171

**Ровнягина Н. Р., Тихонова Т. Н., Молоденский Д. С., Ширшин Е. А.** Детектирование конформационных изменений альбумина при его гликировании и термической денатурации методами флуоресцентной спектроскопии и малоуглового рентгеновского рассеяния

179

**Дубровский В. А., Торбин С. О.** Эффект «высвечивания» лейкоцитов и его применение для идентификации клеток крови методом цифровой микроскопии

191

### Приложения

#### Из истории физики

**Аникин В. М.** Первая нобелевская (к 60-летию присуждения Нобелевской премии академику Н. Н. Семёнову)

201

Журнал включен в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук

Зарегистрировано в Федеральной службе по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций.

Свидетельство о регистрации СМИ ПИ № ФС77-56150 от 15 ноября 2013 года

Индекс издания в объединенном каталоге «Пресса России» 36015, раздел 30 «Научно-технические издания. Известия РАН. Известия вузов». Журнал выходит 4 раза в год

**Директор издательства**  
Бучко Ирина Юрьевна

**Редактор**  
Каргин Игорь Анатольевич

**Художник**  
Соколов Дмитрий Валерьевич

**Редактор-стилист**  
Кочкаева Инна Анатольевна

**Верстка**  
Ковалева Наталья Владимировна

**Технический редактор**  
Багаева Ольга Львовна

**Корректор**  
Кочкаева Инна Анатольевна

**Адрес учредителя, издателя и издательства:**  
410012, Саратов, ул. Астраханская, 83  
**Тел.:** (845-2) 51-45-49, 52-26-89  
**E-mail:** izvestiya@sgu.ru

Подписано в печать 28.08.2017.  
Формат 60×84 1/8.  
Усл. печ. л. 9.39 (10.0).  
Тираж 500 экз. Заказ 93-Т.

Отпечатано в типографии  
Саратовского университета.  
**Адрес типографии:**  
410012, Саратов, Б. Казачья, 112А

© Саратовский университет, 2017



## ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

Журнал публикует на русском и английском языках научные статьи по физике, содержащие новые результаты исследований, статьи учебно-методического характера, содержащие инновационную компоненту, статьи по методологии разделов физической науки, статьи, отражающие хронику научных мероприятий и важных событий в жизни физического сообщества. Материалы, ранее опубликованные или представленные для публикации в другие журналы, к рассмотрению не принимаются.

Рекомендуемый объем статьи – до 16 страниц текста, 5 рисунков и 4 таблицы, объем краткого сообщения – до 6 страниц текста, 2 рисунка и 2 таблицы. Таблицы не должны превышать 20% общего объема статьи.

На русском языке статья содержит: УДК, заглавие, инициалы и фамилии авторов, название их места работы, электронный адрес автора, с которым ведётся переписка, аннотацию (150–200 слов), ключевые слова (не более 15), текст, благодарности и ссылки на гранты, список литературы.

На английском языке необходимо продублировать: заглавие, инициалы и фамилии авторов, аннотацию (200–250 слов), ключевые слова, список литературы (references).

Редколлегия рекомендует авторам структурировать текст, используя подзаголовки. Текст должен быть набран и напечатан через 1,5 интервала на бумаге формата А4 с полями 2,5 см, шрифт Times New Roman, размер шрифта основного текста – 14, второстепенного (аннотация, ключевые слова, сноски, таблицы, подписи к рисункам, приложения, список литературы, примечания) – 12; все страницы рукописи, таблицы, рисунки, следует пронумеровать. Иллюстрации и таблицы предоставляются дополнительно отдельным файлом. Рисунки должны быть в формате TIFF, JPG, CDR, BMP с разрешением не меньше 300 dpi. Нумерация источников в списке литературы должна соответствовать очередности ссылок на них в тексте, ссылки на неопубликованные работы не допускаются.

Все рукописи, поступившие в редакцию и соответствующие профилю журнала, проходят рецензирование и затем редколлегия принимает решение о возможности их опубликования в журнале. В случае положительного решения об опубликовании статья подвергается научному и контрольному редактированию.

Автору статьи, принятой к публикации, одновременно с решением редколлегии высылается лицензионный договор. Плата за публикацию рукописей не взимается. Более подробно с правилами для авторов и порядком рецензирования можно ознакомиться на сайте журнала: <http://fizika.sgu.ru>.

Адрес редколлегии серии: 410012, Саратов, ул. Астраханская, 83, СГУ имени Н. Г. Чернышевского, физический факультет.

Тел. / факс: +7(845-2) 51-14-30.

E-mail: [fizika.sgu@bk.ru](mailto:fizika.sgu@bk.ru)

Website: <http://fizika.sgu.ru>

## CONTENTS

### Scientific Part

#### Optics and Spectroscopy. Laser Physics

**Khlebtsov B. N., Pylaev T. E.,  
Khanadeev V. A., Khlebtsov N. G.**

Application of Dynamic Light Scattering and Absorption Spectroscopy to Studies of Systems with Colloidal Gold Nanoparticles + DNA 136

#### Biophysics and Medical Physics

**Nikitin S. Yu., Ustinov V. D.,  
Tsybrov E. G., Priezhev A. V.**

Improved Data Processing Algorithm for Laser Ektacytometry of Red Blood Cells 150

**Belikov A. V., Skrypnik A. V., Antropova M. M.**

Monte Carlo Simulation of Laser Radiation Propagation in the Multilayers Model of Head and Brain Tissues in Health and in the Presence of Intracranial Hematoma 158

**Sergeeva I. A., Khitrina K. A., Krot A. R.,  
Sukneva A. V., Petrova G. P.**

Investigation of the Interaction and Dynamics of Collagen and Collagenase Molecules in Solutions by Dynamic Light Scattering 171

**Rovnyagina N. R., Tikhonova T. N.,  
Molodenskiy D. S., Shirshin E. A.**

Albumin Conformational Changes During Glycation and Thermal Denaturation Processes Revealed by Fluorescence Spectroscopy and Small-angle X-ray Scattering 179

**Doubrovski V. A., Torbin S. O.**

Leukocytes' «Highlighting» Effect and its Application to Identify Blood Cells by Digital Microscopy Method 191

### Appendices

#### From the History of Physics

**Anikin V. M.**

The First Nobel Prize (To the 60th Anniversary of the Awarding of the Nobel Prize to Academician N. N. Semenov) 201



**РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ ЖУРНАЛА  
«ИЗВЕСТИЯ САРАТОВСКОГО УНИВЕРСИТЕТА. НОВАЯ СЕРИЯ.  
СЕРИЯ: ФИЗИКА»**

**Главный редактор**

Усанов Дмитрий Александрович, доктор физ.-мат. наук, профессор (Саратов, Россия)

**Заместители главного редактора**

Анищенко Вадим Семенович, доктор физ.-мат. наук, профессор (Саратов, Россия)

Тучин Валерий Викторович, доктор физ.-мат. наук, профессор (Саратов, Россия)

**Ответственный секретарь**

Скрипаль Анатолий Владимирович, доктор физ.-мат. наук, профессор (Саратов, Россия)

**Члены редакционной коллегии:**

Аникин Валерий Михайлович, доктор физ.-мат. наук, профессор (Саратов, Россия)  
Бабков Лев Михайлович, доктор физ.-мат. наук, профессор (Саратов, Россия)  
Вадивасова Татьяна Евгеньевна, доктор физ.-мат. наук, профессор (Саратов, Россия)  
Вениг Сергей Борисович, доктор физ.-мат. наук, профессор (Саратов, Россия)  
Винницкий Сергей Ильич, доктор физ.-мат. наук, профессор (Дубна, Россия)  
Горохов Александр Викторович, доктор физ.-мат. наук, профессор (Самара, Россия)  
Грибов Лев Александрович, доктор физ.-мат. наук, профессор, чл.-корр. РАН (Москва, Россия)  
Давидович Михаил Владимирович, доктор физ.-мат. наук, профессор (Саратов, Россия)  
Дюбуа Арно, Ph.D, профессор университета Париж-Сакле (Сент-Обен, Франция).  
Кузнецов Сергей Петрович, доктор физ.-мат. наук, профессор (Саратов, Россия)  
Малышев Сергей Александрович, доктор физ.-мат. наук, доцент (Минск, Беларусь)  
Мельников Леонид Аркадьевич, доктор физ.-мат. наук, профессор (Саратов, Россия)  
Модельский Иосиф, Ph.D, профессор (Варшава, Польша)  
Нефёдов Игорь Сергеевич, доктор физ.-мат. наук, ст. науч. сотрудник университета Аалто (Хельсинки, Финляндия)  
Никитов Сергей Аполлонович, доктор физ.-мат. наук, профессор, чл.-корр. РАН (Москва, Россия)  
Пирогов Юрий Андреевич, доктор физ.-мат. наук, профессор (Москва, Россия)  
Сербино Роберто, Ph.D, профессор Миланского университета (Милано, Италия).  
Скрипаль Александр Владимирович, доктор физ.-мат. наук, профессор (Саратов, Россия)  
Сухоруков Глеб Борисович, профессор Университета Королевы Марии (Лондон, Великобритания)  
Трубецков Дмитрий Иванович, доктор физ.-мат. наук, профессор, чл.-корр. РАН (Саратов, Россия)  
Филимонов Юрий Александрович, доктор физ.-мат. наук, профессор (Саратов, Россия)  
Хлебцов Николай Григорьевич, доктор физ.-мат. наук, профессор (Саратов, Россия)  
Шараевский Юрий Павлович, доктор физ.-мат. наук, профессор (Саратов, Россия)  
Шиманский-Гайер Лутц, Ph.D, профессор Гумбольдтского университета (Берлин, Германия)

**EDITORIAL BOARD OF THE JOURNAL  
«IZVESTIYA OF SARATOV UNIVERSITY. NEW SERIES.  
SERIES: PHYSICS»**

**Editor-in-Chief** – Dmitry A. Usanov (Saratov, Russia)

**Deputy Editor-in-Chief** – Vadim S. Anishchenko (Saratov, Russia)

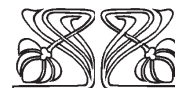
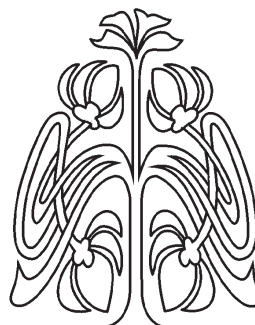
Valery V. Tuchin (Saratov, Russia)

**Executive Secretary** – Anatoly V. Skripal' (Saratov, Russia)

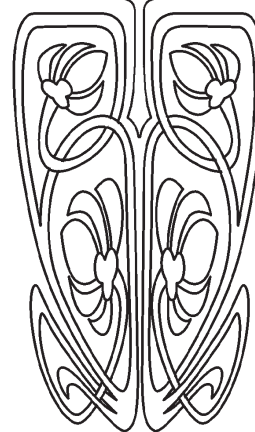
**Members of the Editorial Board:**

Valery M. Anikin (Saratov, Russia)  
Lev M. Babkov (Saratov, Russia)  
Roberto Cerbino (Milan, Italy)  
Michael V. Davidovich (Saratov, Russia)  
Arnaud Dubois (Palaiseau, France)  
Yuri A. Filimonov (Saratov, Russia)  
Alexander V. Gorokhov (Samara, Russia)  
Lev A. Gribov (Moscow, Russia)  
Nikolai G. Khlebtsov (Saratov, Russia)  
Sergey P. Kuznetsov (Saratov, Russia)  
Igor S. Nefedov (Helsinki, Finland)  
Sergei A. Nikitov (Moscow, Russia)

Sergey A. Malyshev (Minsk, Belarus)  
Leonid A. Melnikov (Saratov, Russia)  
Joseph W. Modelski (Warsaw, Poland)  
Yuri A. Pirogov (Moscow, Russia)  
Shimansky-Geier Lutz (Berlin, Germany)  
Yuri P. Sharaevsky (Saratov, Russia)  
Alexander V. Skripal' (Saratov, Russia)  
Gleb B. Sukhorukov (London, UK)  
Dmitry I. Trubetskov ((Saratov, Russia)  
Tatyana E. Vadivasova (Saratov, Russia)  
Sergey I. Vinitzky (Dubna, Russia)  
Sergey B. Venig (Saratov, Russia)



**РЕДАКЦИОННАЯ  
КОЛЛЕГИЯ**





## ОПТИКА И СПЕКТРОСКОПИЯ. ЛАЗЕРНАЯ ФИЗИКА

УДК 535.36+541.182.535.36

### ПРИМЕНЕНИЕ СПЕКТРОСКОПИИ ПОГЛОЩЕНИЯ И ДИНАМИЧЕСКОГО РАССЕЯНИЯ СВЕТА В ИССЛЕДОВАНИЯХ СИСТЕМ ЗОЛОТЫХ НАНОЧАСТИЦ + ДНК

Б. Н. Хлебцов, Т. Е. Пылаев, В. А. Ханадеев, Н. Г. Хлебцов

Хлебцов Борис Николаевич, доктор физико-математических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории нанобиотехнологии, Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук (Саратов), khlebtsov\_b@ibppm.ru

Пылаев Тимофей Евгеньевич, кандидат биологических наук, ученый секретарь, Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук (Саратов), pylaev\_t@ibppm.ru

Ханадеев Виталий Андреевич, кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник лаборатории нанобиотехнологии, Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук (Саратов), khanadeev\_v@ibppm.ru

Хлебцов Николай Григорьевич, доктор физико-математических наук, заведующий лабораторией нанобиотехнологии, Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук (Саратов); профессор кафедры материаловедения, технологии и управления качеством, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, khlebtsov@ibppm.ru

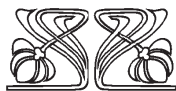
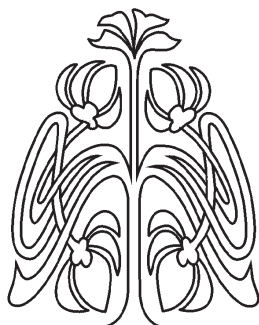
Метод динамического рассеяния света (ДРС) является широко используемым лабораторным тестом для оценки дисперсного состава зольей, однако он не свободен от ряда недостатков. Для быстрой приближенной оценки среднего размера и концентрации золотых наночастиц (ЗНЧ) в диапазоне 15–100 нм разумные значения дает спектроскопия поглощения с использованием аналитической и графической зависимостей, приведенных в работе. Для частиц с диаметром 3–15 нм в работе приведен калибровочный график для определения размера, основанный на измерении отношения пиков поглощения в максимуме и при 450 нм. Обсуждаются сравнительные достоинства и недостатки различных методов и отмечается, что метод ДРС является на сегодняшний день единственным методом для невозмущающей и чувствительной диагностики сравнительно медленных агрегационных процессов с характерными временами порядка минут. В качестве примера рассмотрено применение ДРС для оценки концентрации олигонуклеотидов (коротких фрагментов одноцепочечной ДНК (оцДНК)). Метод основан на регистрации среднего размера агрегатов, формирующихся при гибридизации оцДНК в системе, содержащей конъюгаты ЗНЧ с оцДНК зондами и комплементарные им оцДНК-мишени.

**Ключевые слова:** золотые наночастицы, распределение частиц по размерам, динамическое рассеяние света, электронная микроскопия, спектроскопия поглощения, олигонуклеотиды, агрегация наночастиц.

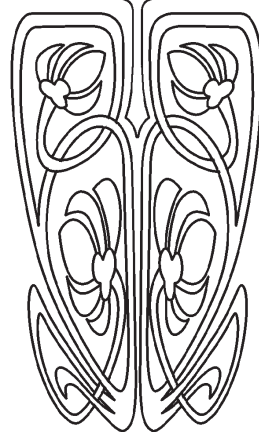
DOI: 10.18500/1817-3020-2017-17-3-136-149

#### Введение

В современной лабораторной практике метод ДРС оказался востребованным как сравнительно простой невозмущающий и оперативный метод определения дисперсного состава коллоидов



НАУЧНЫЙ  
ОТДЕЛ







и суспензий. Возможности достаточно простого определения распределения по размерам частиц и анализа агрегационных процессов стимулировали развитие многочисленных приложений ДРС, отраженных в монографии [1] и статьях (см., например, ссылки в [2–7]), в том числе в многочисленных биологических приложениях [8–19].

Наш опыт применения одной из разработок – прибора Zetasizer Nano ZS [20], показал, что некритическое использование метода ДРС без контроля с помощью трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) может иногда приводить к артефактам [21].

В предыдущей статье [22] мы дали краткий обзор предшествующих результатов по применению метода ДРС для двух типов наноразмерных систем:

1) непоглощающие рассеивающие диэлектрические наночастицы диоксида кремния (силикатные наночастицы) с диаметром от десятков до сотен нанометров [23, 24];

2) ЗНЧ с доминирующим поглощением (диаметр менее 15 нм) и сильным рассеянием света (диаметр более 30 нм) [21].

В данной работе в дополнение к методу ДРС мы кратко обсуждаем также использование обычной спектроскопии поглощения для оценки среднего размера золотых наночастиц в широком диапазоне от 3 до 100 нм (более детальное обсуждение можно найти в работах [25–28]). В разделе 2 анализируются достоинства и недостатки методов ТЭМ, ДРС и спектроскопии поглощения в оценке размеров ЗНЧ. В качестве экспериментального примера рассматривается количественное определение коротких фрагментов одноцепочечной ДНК (оцДНК-мишеней) [29], основанное на регистрации среднего размера агрегатов, формирующихся при гибридизации оцДНК в системе, содержащей конъюгаты ЗНЧ с оцДНК зондами и комплементарные оцДНК-мишени.

### 1. Определение среднего размера ЗНЧ по спектрам экстинкции

В предыдущей статье [22] мы кратко обсудили проблемы, возникающие при определении размеров золотых и силикатных наночастиц методом ДРС. В тех случаях, когда нет возможности для доступного и оперативного применения ТЭМ или ДРС и нужна быстрая оценка хотя бы среднего размера частиц коллоидного золота, а не полного распределения по размерам, можно,

как нам кажется, воспользоваться обычной спектроскопией поглощения, если спектрофотометр имеет монохроматор с разрешением порядка 0.5 нм. Недостатки этого подхода будут обсуждены ниже.

Принцип определения среднего из спектров экстинкции основан на хорошо известном смещении плазмонного резонанса наночастиц КЗ в красную область с увеличением их размера [8]. При этом аккуратное воспроизведение спектров экстинкции реальных образцов требует учета эффектов полидисперсности по размерам и форме частиц, а также зависимости оптических констант от размера частиц, как это было впервые показано строгим методом Т-матриц в [25] и недавно с использованием дипольного приближения [30]. Учитывая, что вопрос о применении теории Ми для калибровки среднего размера по положению плазмонного резонанса был недавно детально обсужден в работах [25–27], мы ограничимся здесь сжатым изложением.

На рис. 1, а приведены экспериментальные данные из пяти работ вместе с аналитической аппроксимацией (рис. 1, б), предложенной в [28] на основе измерений, обсужденных в [25]:

$$d = \begin{cases} 3 + 7.5 \times 10^{-5} X^4, & X < 23 \\ [\sqrt{X - 17} - 1] / 0.06, & X \geq 23 \end{cases}, \quad X(\text{nm}) = \lambda_{\text{max}} - 500. \quad (1)$$

В отличие от работы [25] приведенный здесь набор экспериментальных данных включает только те источники, в которых решались метрологические задачи сопоставления положения плазмонного резонанса со средним ТЭМ размером. В дополнение мы приводим также недавние данные группы W. Chan [31], где ТЭМ измерения в широком диапазоне размеров коллоидных частиц, полученных в однотипной технологии, сопоставлены со спектроскопией поглощения. Более полный набор экспериментальных данных, включающий пары  $(\lambda_{\text{max}}, d_{\text{ТЕМ}})$  из ряда прикладных работ, приведен в нашем обзоре [9].

Для оценки средних ошибок спектрального метода мы использовали пять наборов экспериментальных данных, показанных на рис. 1, а, и сгруппировали их по ТЭМ диаметрам частиц в диапазонах от 5 до 30 нм (шаг 5 нм) и от 30 до 100 нм (шаг 10 нм). По каждой группе были рассчитаны среднеквадратические стандартные отклонения, показанные на рис. 1, б вертикальными линиями. Как видно из кривой 2, приведенной на рис. 1, б, имеется заметный разброс

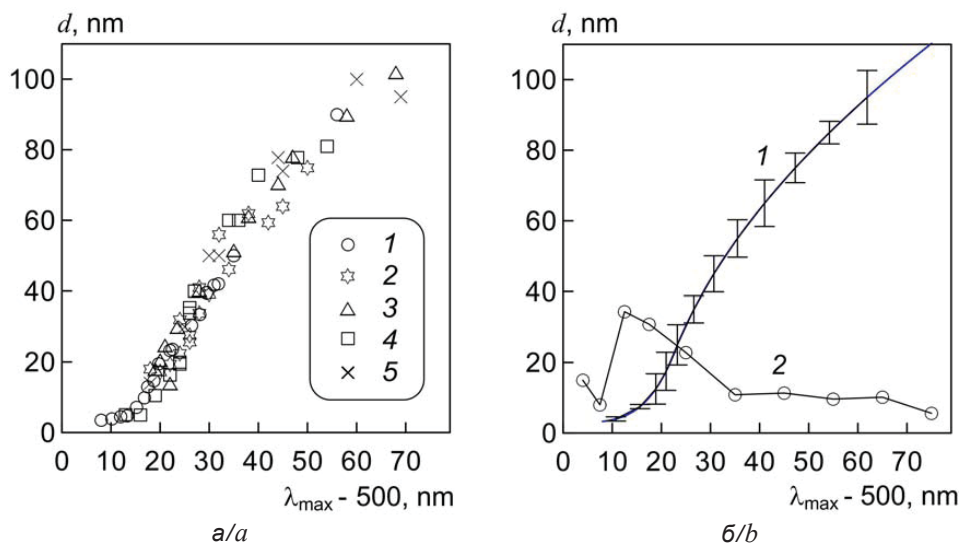


Рис. 1. Калибровочная кривая для определения среднего размера наночастиц КЗ по положению плазмонного резонанса экстинкции. Точками 1–4 на панели (а) показаны экспериментальные данные из работ, указанных в [28], точками 5 – в обзоре [9]. На панели (б) приведена аналитическая аппроксимация (кривая 1) по формуле (1) и среднеквадратические отклонения экспериментальных данных ( $\pm\sigma$ ), рассчитанные, как описано в тексте, по экспериментальным точкам (а). Кривая 2 показывает относительные ошибки ( $\sigma/d_{av}$ )

Fig. 1. Calibration curve for determination of the average size of CG nanoparticles by a position of the plasmonic extinction resonance. The points 1–4 in panel (a) show the experimental data taken from papers indicated in Ref. [28] and review [32] (5). In the panel (b) the analytical approximation (curve 1) as calculated by Eq. (1) is shown together with standard root-mean deviations of the experimental data ( $\pm\sigma$ ), that were calculated as described in the text by using experimental points in the panel (a). Curve 2 shows the normalized errors ( $\sigma/d_{av}$ )

данных экспериментов и среднеквадратическая ошибка может достигать 35% по отношению к данным ТЭМ, но в среднем уровень отклонения данных ТЭМ от калибровки порядка 10–20%, т.е. примерно такой же, как и в методе ДРС. Таким образом, приведенные на рис. 1, б экспериментальные результаты, полученные независимо в пяти опубликованных измерениях разных групп, показывают возможность применения простой калибровки 1 для быстрой оценки среднего размера с использованием обычных спектрофотометров, доступных для любой лаборатории. Однако следует иметь в виду, что в ряде случаев опубликованные данные по парам ( $\lambda_{max}$ ,  $d_{TEM}$ ) отклоняются от калибровки 1 на рис. 1, б существенно больше.

Как видно из рис. 1, для диаметров менее 10 нм измерения положения максимума экстинкции становятся бесполезными, потому что сдвиг плазмонного резонанса определяется ограничением длины пробега электронов в малых частицах (размерный эффект для диэлектрической функции), а чувствительность калибровки становится очень

слабой. Для диапазона размеров 1–10 нм можно использовать два подхода [28]. Первый заключается в измерении отношения  $A_{max}/A_{min}$  [32], где минимальное значение обычно измеряется около 450 нм [27, 28]. Для примера на рис. 2 приведена калибровка, позволяющая определить средний эквиобъемный диаметр малых полидисперсных наночастиц КЗ по отношению экстинкций  $A_{max}/A_{450}$ , измеренных на длине волны резонанса и 450 нм. Отметим, что с увеличением размера от 2 до 15 нм положение теоретического резонанса с учетом размерного изменения оптических констант изменяется от 508 до 516 нм. Влияние формы частиц на зависимости такого типа обсуждалось в [28]. Экспериментальные примеры использования этого метода приведены в работе [27].

Размерный эффект оптических констант золотых наночастиц приводит также к уширению слабого плазмонного резонанса, которое можно измерить и сопоставить с теоретической калибровкой. Этот подход анализировался в работе [33].

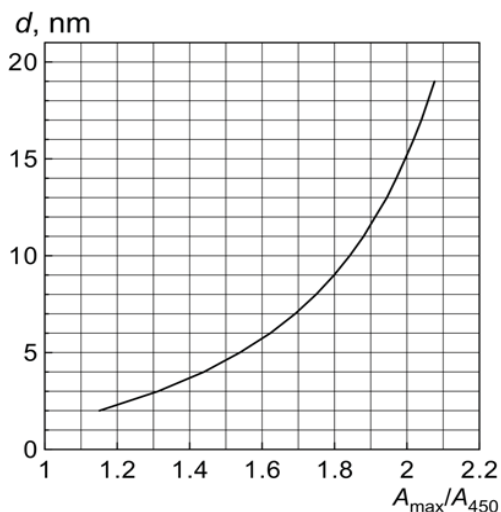


Рис. 2. Калибровочная зависимость для определения среднего размера наночастиц КЗ по отношению значений экстинкции  $A_{\max}/A_{450}$ . Расчет по теории Ми для нормального распределения полидисперсных золотых частиц с нормированным стандартным отклонением  $\sigma/d_{av} = 30\%$

Fig. 2. Calibration curve for determination of the average size of CG nanoparticles from the extinction ratio  $A_{\max}/A_{450}$ . Calculations were carried out by Mie theory using a normal size distribution for polydisperse gold nanoparticles with normalized standard deviation  $\sigma/d_{av} = 30\%$

## 2. Сравнение методов ТЭМ, ДРС и спектроскопии поглощения в оценке средних размеров ЗНЧ

Приведенные выше результаты требуют обсуждения, чтобы у читателей не создалось ложного впечатления о принципиальных недостатках метода ДРС вообще, безотносительно к проблемам других методов. Во избежание недоразумений подчеркнем, что все дальнейшее обсуждение относится в основном только к коллоидным золотым частицам, получаемым стандартными методами восстановления  $\text{HAuCl}_4$ .

Вряд ли стоит напоминать, что ТЭМ и ДРС по своим принципам дают разную, хотя и сопоставимую информацию о дисперсном составе коллоида. ТЭМ изображения являются случайными выборками препарированного образца на сеточке, поэтому всегда имеются две проблемы. Первая – это изменения в образце, происходящие в процессе препарирования. Вторая – это обеспечение неискажающей статистики выборок изображений. К счастью, для золотых наночастиц проблема первого типа отсутствует, если нас интересует *только распределение по размерам индивидуальных частиц* безотносительно к их возможной *агрегации* в коллоиде. Само собой

разумеется, что образец должен быть подготовлен к ТЭМ анализу по общепринятым протоколам (отмыт, ресуспендирован и т.п.), чтобы не возникало никаких артефактов препарирования при сушке образца на ТЭМ сетке (продолжение роста, слипание частиц, искажение их формы и размера и т.д.). Вторая проблема решается обычными средствами статистики и тщательным просмотром всех участков сетки (что может быть достаточно трудоемким процессом). Наш опыт и данные других публикаций показывают, что обычно обсчет 1000 частиц с одного участка сетки статистически не отличается от обсчета по другому случайно выбранному участку. При обеспечении перечисленных условий метод ТЭМ дает прекрасно воспроизводимые результаты и на сегодняшний день является «золотым стандартом», принятым во всех без исключения лабораториях мира (судя по нашей базе данных, включающей более 4000 источников с 1995 по 2016 г.). Здесь уместно подчеркнуть, что для биологических частиц метод ТЭМ сразу теряет свое основное преимущество из-за хорошо известных проблем препарирования. Кроме того, трудоемкость ТЭМ и проблемы его корректного применения сильно возрастают в случае *кинетических* исследований.

Бесспорным преимуществом метода ДРС, как и большинства других оптических методов, является возможность исследования дисперсного состава *in situ* с усреднением данных по большому ансамблю частиц, попадающих в зондируемый объем. Скажем, для типичного объема когерентности в методе ДРС порядка  $10^{-3} \text{ см}^3$  число анализируемых частиц в типичном золотом коллоиде с оптической плотностью 1 в кювете толщиной 1 см на резонансной длине волны около 520 нм будет порядка  $10^8$ – $10^9$ . Такой ансамбль невозможно исследовать методом ТЭМ. Во-вторых, метод ДРС можно применять и для *медленных* кинетических процессов с характерными временами меньше времени накопления автокорреляционной функций фототока (5–30 мин). Для биологических частиц невозмущающий характер ДРС может быть решающим фактором. Кроме того, по сравнению с большинством других оптических методов, метод ДРС определяет функцию распределения по размерам без априорной информации об оптических свойствах частиц (см., впрочем, ниже). Альтернативой могут рассматриваться только варианты метода «пролетной индикатрисы» [34] или спектральной прозрачности [35].



Как было показано в [22], для частиц КЗ-16 метод ДРС в распределении интенсивностей рассеяния дает две сильно различающиеся моды, одна из которых близка по размерам к ТЭМ размерам частиц КЗ, а вторая имеет максимум в области 200 нм. Вопрос об интерпретации этой фракции нетривиален и связан с принципиальной особенностью всех методов светорассеяния, включая ДРС. Если размер частиц мал и соответствует условиям рэлеевского рассеяния, то интенсивность пропорциональна квадрату модуля поляризуемости, т.е. квадрату объема частицы. Ясно, что рассеиватели большого объема всегда имеют непропорционально доминирующий оптический вес и могут исказить информацию от интересующих нас наночастиц даже при ничтожной числовой доле. Это видно уже из пересчета распределения интенсивностей в распределения объемов и числа частиц. Только по данным ДРС ничего нельзя сказать о природе этих 200-нм частиц. Они могут быть просто частицами «пыли», крупными «нецелевыми» частицами золота или случайными агрегатами золотых наночастиц. Однако можно показать (данные здесь не представлены), что при одних и тех же условиях цитратного синтеза постепенный переход от среднего размера 15 нм к размерам 20, 25, 30 нм сопровождается заметным уменьшением второго максимума в распределении интенсивностей и переходу к полностью одномодовому распределению. Это является сильным аргументом в пользу предположения о том, что речь идет просто о паразитной информации в случае слабо рассеивающих частиц КЗ-16, которая

перестает влиять, как только рассеяние самих частиц КЗ начинает возрастать.

К сожалению, начиная с размера частиц КЗ порядка 40–50 нм, в ДРС измерениях начинает проявляться второй эффект – паразитная мода в области малых размеров, обусловленная вращательным движением несферических частиц. Подчеркнем еще раз, что этот эффект обусловлен именно формой и не наблюдается, скажем, для наносфер диоксида кремния в очень широком диапазоне размеров [23] и для золотых нанобочечек, выращенных на этих ядрах [36].

Мы показали ранее [21], что паразитное влияние вращательного движения можно исключить переходом к малым углам рассеяния или соответствующей настройкой коррелятора. Более того, измеряя *угловую зависимость* автокорреляционной функции, можно сделать некоторые выводы о форме частиц, но только качественного характера (см., например, сравнение данных ДРС и ТЭМ по форме частиц в [37, 38]). К сожалению, большинство коммерческих приборов (включая Zetasizer Nano ZS) не имеют этой полезной опции.

Второй вопрос, который следует обсудить, это адекватность среднего размера и дисперсии ДРС-распределения по размерам результатам ТЭМ анализа. Согласно данным таблицы, имеется определенное согласие между средними диаметрами КЗ-16, однако данные ДРС могут быть внутренне противоречивы: измерения при разных углах могут дать разные размеры даже после отсечки моды вращательного движения (таблица). Отметим также, что данные ТЭМ и ДРС для КЗ-60 различаются существенно.

**Средние диаметры и полуширины распределений образцов КЗ-16 и КЗ-60 по данным ТЭМ и ДРС**

**The average diameters and FWHM of the size-distributions of samples CG-16 and CG-60 according to TEM and dynamic light scattering (DLS) data**

Образец Sample	$d_N(\sigma\%), \text{ nm}$	$d_N(\sigma\%), \text{ nm}$		$d_V(\sigma\%), \text{ nm}$	
	ТЭМ TEM	ДРС DLS, 13°	ДРС DLS, 173°	ДРС DLS, 13°	ДРС DLS, 173°
CG-16	15.8 (8.9%)	–	13.2 (23%)	–	16.4 (33%)
CG-60	59.4 (8.9%)	66.2 (16.3%)	32 (25%)	69 (19%)	42 (33%)

Выше мы отмечали, что метод ДРС иногда считают единственным, который дает распределение по размерам частиц *in situ*. Однако вопрос об адекватности этого распределения числовому распределению частиц по размерам в коллоиде часто опускается. Единственной

*прямой* информацией метода ДРС является распределение интенсивностей рассеяния по коэффициентам броуновской диффузии [1]. Пересчет этого распределения, скажем, в распределение агрегатов наносфер по *гидродинамическим* размерам, – задача практически не решаемая, поэтому





разработчики оборудования ДРС часто переключают эти серьезные проблемы на конечного пользователя, предоставляя в его распоряжение файл с автокорреляционной функцией или распределением по интенсивностям рассеяния. Если исследуемый объект можно как-то описать моделями Стокса-Эйнштейна (пересчет коэффициента диффузии в гидродинамический размер для одной идеальной сферы в бесконечной покоящейся жидкости) и Ми (пересчет интенсивности в число частиц данного размера), то тогда и только тогда решение обратной задачи будет корректным для модели изотропных однородных не взаимодействующих однократно рассеивающих сфер. Ясно, что эта модель может быть далека от реального объекта (см. [22, рис. 3]). Даже для сферических частиц показатели степени в пересчетных формулах от интенсивности рассеяния к размеру частиц зависят от свойств материала, ширины распределения и т.д. (см. обсуждение этого вопроса в [39]). Не следует также забывать, что даже в простых случаях (сферы с полимерным покрытием) метод ДРС дает информацию о гидродинамическом размере всего комплекса, а не о геометрическом размере самой частицы.

Как мы видели выше, дисперсия ДРС размеров обычно всегда завышена по сравнению с данными ТЭМ. В нашем случае – примерно в 2–4 раза. Поучительно сравнить наши дисперсии для коллоидов КЗ-16 и КЗ-60 с тщательными ТЭМ измерениями наночастиц, полученных по оригинальным протоколам синтеза в [26] и [27] (рис. 3).

Хорошо видно, что для частиц КЗ-16 наш результат весьма близок к [27], а для КЗ-60 наша дисперсия (8.9%) примерно в 2.5 раза больше средней величины [27] для этого диапазона размеров, но меньше значения 14% для частиц КЗ-60, исследованных в [26]. Таким образом, дисперсия размеров наших образцов типична для частиц КЗ. Сопоставляя рис. 3 с данными таблицы и учитывая другие опубликованные данные [8, 25], мы приходим к следующему принципиальному выводу: дисперсия распределения наночастиц КЗ по размерам, получаемая методом ДРС, неадекватна дисперсии числового ТЭМ распределения по размерам и обычно завышена. Это завышение обусловлено несколькими факторами. Во-первых, метод ДРС учитывает оптические вклады от неболь-

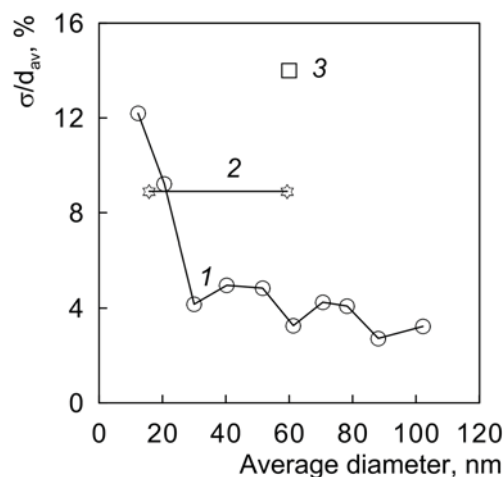


Рис. 3. Относительная полуширина ТЭМ распределения числа частиц по размерам для коллоидов со средними диаметрами 12.3, 20.6, 30, 40.3, 51.6, 61.3, 70.6, 78.3, 88.1 и 102.2 нм: 1 – адаптировано по данным [27], 2 – для коллоидов КЗ-16 и КЗ-60, 3 – данные [26] для КЗ-60

Fig. 3. Normalized width of TEM particle size distribution for colloids with the average diameters 12.3, 20.6, 30, 40.3, 51.6, 61.3, 70.6, 78.3, 88.1, and 102.2 nm: 1 – adapted from data of Ref. [27], 2 – for colloids CG-16 and CG-60, 3 – data of Ref. [26] for CG-60

шой доли крупных частиц, которые обычно не представляют интереса и игнорируются в ТЭМ анализе. Во-вторых, сама по себе процедура обращения интегрального уравнения Фредгольма первого рода в методе ДРС вносит неизбежное уширение, не имеющее отношение к коллоиду [1]. Наконец, в реальном коллоиде *in situ* могут формироваться и разрушаться агрегаты, которые будут отражаться в корреляциях фототока, но обычно игнорируются в ТЭМ анализе. Отметим, что уширение распределения в методе ДРС уже неоднократно описывалось в литературе даже для простейших латексных систем [40].

Оценка среднего размера по сдвигу плазмонного резонанса также имеет свои достоинства и недостатки. Прежде всего, речь вовсе не идет о функции распределения по размерам. Более того, даже при определении среднего размера, как показывает наш почти 20-летний экспериментальный опыт [8], надежные результаты получаются только в рамках однотипного, протестированного протокола синтеза при обязательном исключении агрегации. Наличие лиганда типа IgG или тиолированных молекул полиэтиленгликоля на поверхности частиц обычно приводит к не-



большому сдвигу порядка 3 нм для экстинкции и 4-5 нм для рассеяния [11]. Конечно, в этом случае и метод плазмонного сдвига, и метод ДРС нельзя применять для характеристики самих нефункционализованных частиц. Например, экспериментально было показано [11], что для частиц типа КЗ-16 адсорбция молекул IgG увеличивает гидродинамический диаметр с 18 до примерно 28 нм, а в случае желатина – с 18 до 40 нм. Но в данном контексте это не недостаток, а, наоборот, – важное достоинство метода ДРС, позволяющего оценить толщину биополимерной оболочки конъюгата, как это было сделано в [11].

Что касается неконтролируемой небольшой агрегации, то метод плазмонного сдвига обладает наибольшей устойчивостью к этому эффекту, по сравнению с ДРС или методом дифференциального рассеяния [41]. В частности, это было показано экспериментально и теоретически в [42] для модельных смесей золотых коллоидов и в [41] для случая агрегации, инициированной биоспецифическими взаимодействиями конъюгатов наночастиц с молекулами-мишенями. Физическая причина этой устойчивости достаточно проста. В приближении слабого взаимодействия поглощение малых частиц определяется мнимой частью их поляризуемости и пропорционально объему. Объединение частиц не изменяет суммарного поглощения до тех пор, пока оптическое взаимодействие не начнет влиять на сечение

поглощения частиц в кластере. Оценки кластерного усиления поглощения в зависимости от межчастичных расстояний и типа кластера даны в работе [43].

### 3. Определение ДНК последовательностей методом ДРС

Как часто бывает, недостаток метода может в определенных обстоятельствах оказаться несомненным достоинством. Например, высокая чувствительность ДРС распределения к образованию даже небольшой доли сильно рассеивающих агрегатов обеспечивает несомненные конкурентные преимущества ДРС перед другими оптическими методами в исследовании биоспецифической агрегации, где метод ТЭМ практически бесполезен. В частности, в цитированных выше работах [12–19] именно эта особенность ДРС была успешно использована в анализе сборки биоконъюгатов золотых наночастиц. В нашей работе [29] метод ДРС был применен в качестве чувствительного теста для количественного определения коротких одноцепочечных ДНК (оцДНК). Метод основан на регистрации оптических эффектов, сопровождающих агрегацию положительно заряженных частиц КЗ, индуцированную реакцией гибридизации оцДНК-зондов и оцДНК-мишеней (рис. 4). Применимость метода ДРС сравнивается с традиционно используемой в аналогичных гибридационных тестах спектроскопией поглощения.

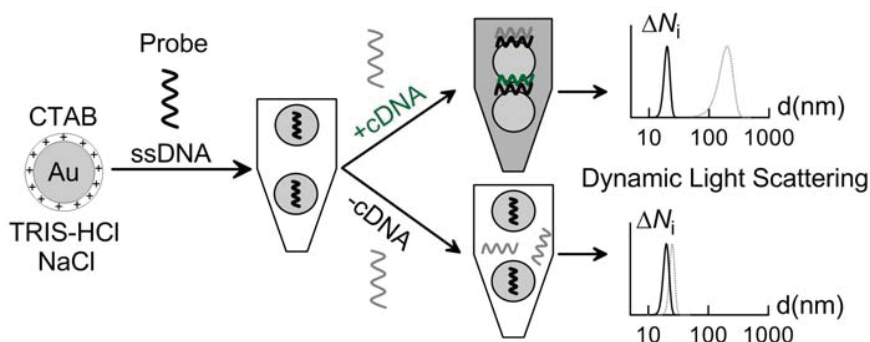


Рис. 4. Схематическое представление колориметрического и ДРС методов для детектирования оцДНК с использованием ЦТАБ-покрытых положительно заряженных золотых наносфер [29]

Fig. 4. Schematic representation of colorimetric and DLS methods to detect ssDNA using CTAB-coated positive charged gold nanospheres [29]

Положительно заряженные сферические 16, 25, и 30 нм наночастицы КЗ (КЗ-16, КЗ-25, КЗ-30) были получены простой функционализацией молекулами цетилтриметиламмонийбромида

(ЦТАБ) [29] отрицательно заряженных частиц, синтезированных по методу Фрэнса. Использование ЗНЧ крупнее 30 нм из-за их низкой стабильности в гибридационных условиях приводит к



плохой воспроизводимости колориметрического теста наряду с отмеченным в [22, рис. 3] заметным отклонением формы цитратных золотых частиц от сферической. Все эксперименты в работе [29] были проведены на двух моделях: маркерной последовательности на определение ВИЧ-1 (модель 1) и маркерной последовательности на определение *Bacillus anthracis* (модель 2).

На рис. 5 показана зависимость концентрации оцДНК-мишени от относительного изменения значения экстинкции, измеренного на длине волны 550 нм,  $\Delta A_{550} / A_{550} = (A_{550}^{target} - A_{550}^{probe}) / A_{550}^{target}$ , выбранной нами для отображения меры агрегации из соответствующих спектров (рис. 5, б). Заметим, что функционализация молеку-

лами ЦТАБ сопровождалась небольшим 5-нм красным сдвигом максимума экстинкции. Для концентраций кДНК (сДНА) ниже, чем 10 пМ, максимальную экстинкцию и относительные изменения  $\Delta A_{550} / A_{550}$  было трудно отличить от случайных изменений экстинкции контрольных образцов с зондовой оцДНК. Согласно калибровке на рис. 5, б нижний концентрационный предел детектирования может быть определен как 100 пМ. Верхний концентрационный предел детектирования кДНК, который составлял около 15 нМ, приводил к сильному изменению цвета суспензии и сильной, зависящей от времени агрегации сразу после добавления кДНК мишени (данные не приведены).

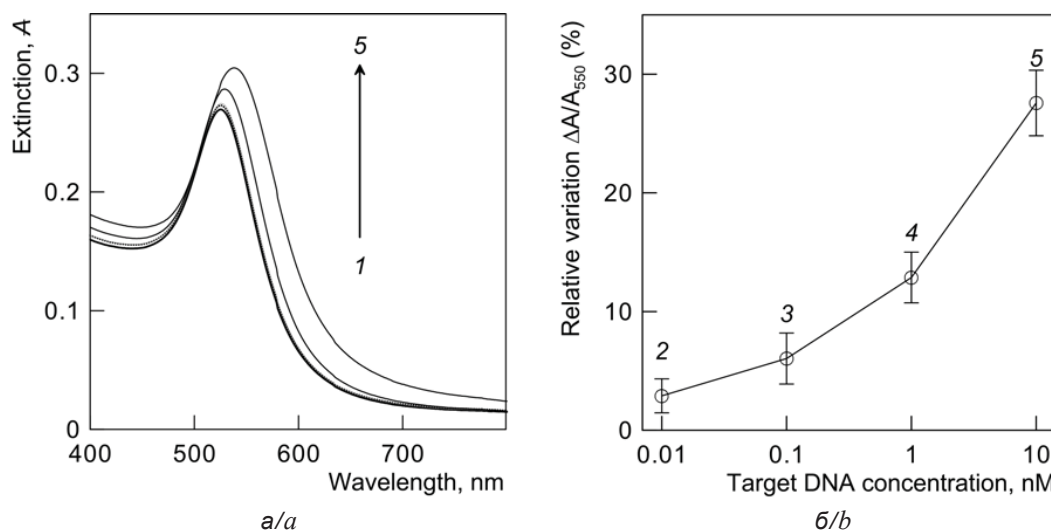


Рис. 5. Спектры экстинкции ЦТАБ-покрытых частиц КЗ-16 в смеси с гибридизационным буфером и зондовой оцДНК  $P_1$  после добавления оцДНК мишени HIV-1 U5 ( $T_1$ ) с концентрациями 0 (1), 0.01 (2), 0.1 (3), 1 (4) и 10 нМ (5) (а) и относительные изменения экстинкции  $\Delta A_{550} / A_{550}$ , определенные из спектров 2–5 (б). Вертикальные бары показывают стандартные отклонения от среднего ( $n = 4$ ) [29]

Fig. 5. Extinction spectra of CTAB-coated nanoparticles CG-16 after mixing with hybridization buffer and probe ssDNA  $P_1$  followed by addition of target ssDNA HIV-1 U5 ( $T_1$ ) at concentrations 0 (1), 0.01 (2), 0.1 (3), 1 (4), and 10 nM (5) (a). Relative changes in extinction  $\Delta A_{550} / A_{550}$  as determined from spectra 2–5 (b). The bars show standard errors of the mean ( $n = 4$ ) [29]

Как уже было отмечено, экстинкция малых агрегатов ЗНЧ в основном определяется поглощением отдельной частицы, а не их индивидуальным рассеянием или рассеянием агрегата в целом. Именно поэтому спектры экстинкции показывают слабую чувствительность детектирования при концентрации оцДНК 0.1–1 нМ. С другой стороны, хорошо известно [1], что в распределении интенсивности рассеяния по размерам доминируют частицы большого размера, поскольку для диэлектрических частиц их вклад

в рассеяние пропорционален квадрату объема, т.е. шестой степени размера. Следовательно, мы можем ожидать повышенной чувствительности детектирования для систем, показанных на рис. 5.

Распределения интенсивности рассеяния по размеру частиц на рис. 6 (вставка) показывают очевидное уширение и сдвиг распределений в область больших размеров уже при 10–100 пМ кДНК. Для исключения влияния рассеяния от загрязняющих частиц и корректного определе-

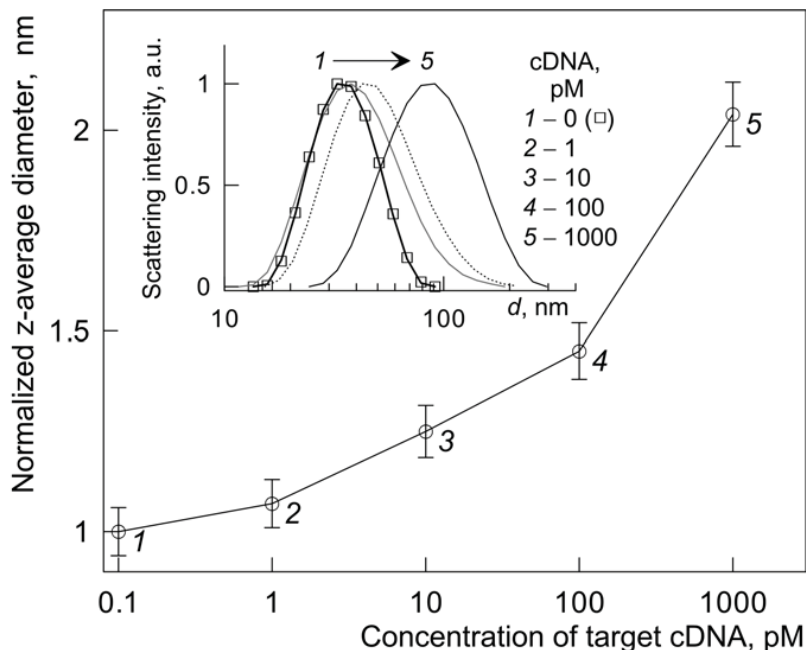


Рис. 6. Концентрационная зависимость среднего диаметра по ДРС, нормализованная к таковым для ЦТАБ-покрытых частиц КЗ-16 в смеси гибридационного буфера и зондовой оцДНК. В качестве погрешности измерений отображены стандартные отклонения от средней величины ( $n=5$ ). На вставке показаны распределения интенсивность–размер ЦТАБ-покрытых частиц КЗ-25 в смеси гибридационного буфера и зондовой оцДНК после добавления оцДНК мишени с концентрациями 0 (1), 1 (2), 10 (3), 100 (4) и 1000 пМ (5) [29]

Fig. 6. Concentration dependence of the average DLS diameter normalized to that for CTAB-coated CG-16 nanoparticles mixed with hybridization buffer and probe ssDNA. The bars show standard errors of the mean ( $n = 5$ ). The inset presents the intensity-size distributions for CTAB-coated nanoparticles CG-25 after mixing with hybridization buffer and probe ssDNA  $P_1$  followed by addition of target ssDNA at concentrations 0 (1), 1 (2), 10 (3), 100 (4), and 1000 pM (5) [29]

ния степени агрегации ЗНЧ мы использовали z-средние диаметры частиц в системе, содержащей оцДНК-мишени, нормированные на z-средние диаметры частиц системы с зондовой оцДНК,  $d_z(T_i)/d_z(P_i)$  ( $i=1,2$ ). Кроме того, чтобы максимально снизить нежелательные эффекты от посторонних случайных рассеивателей, мы не использовали встроенную программу прибора, а непосредственно рассчитывали z-средний размер  $d_z = \sum d_i I_i / \sum I_i$ , используя только первый главный пик распределения интенсивности. Как показано на рис. 6, нормализованное стандартное отклонение составляет около 0.06 и основанный на ДРС нижний предел обнаружения составляет около 10 пМ оцДНК, что существенно меньше предела чувствительности спектроскопии экстинкции, полученного ранее в работах [44, 45].

Следует, однако, отметить, что имеется отличие более чем на два-три порядка в пределах

чувствительности детекции оцДНК, согласно нашим данным и данным работы [44] (10–100 пМ), с одной стороны, и по данным работы [46] (0.1 пМ), с другой. Специальный анализ данных [46] показывает [29], что рекордная чувствительность 0.1 пМ не согласуется с представлениями о возможных механизмах агрегации частиц в системах, содержащих столь низкие концентрации мишеней кДНК.

Отметим, что метод ДРС может быть использован также для определения точечных мутаций. В частности, было показано [29], что нормализованные z-средние ДРС размеры агрегатов закономерно уменьшаются для образцов, содержащих мишени с однобуквенными (single-based mismatch, SBM) и трехбуквенными мисмэтчами (three-based mismatch, TBM), в сравнении с размерами агрегатов образцов, содержащих полностью комплементарные мишени.





## Заключение

Ширина ДРС распределений числа или объемов частиц по размерам в обоих случаях слабого и сильного рассеяния всегда завышена по сравнению с ТЭМ гистограммами. В тех случаях, когда нужна быстрая качественная оценка среднего размера в диапазоне 15–100 нм, разумные значения дает обычная спектроскопия поглощения. Для этой цели можно использовать уравнение (1) или график, приведенный на рис. 1. Для частиц меньшего размера имеет смысл использовать метод отношения экстинкций вместе с калибровкой, приведенной на рис. 2.

Важным достоинством метода ДРС является его высокая чувствительность к агрегации частиц, что позволяет рекомендовать его в качестве более надежного теста, по сравнению со спектроскопией поглощения, для детектирования биоспецифических взаимодействий с применением наночастиц КЗ. В частности, измерение z-среднего размера можно использовать для чувствительного ДРС детектирования ДНК последовательностей. Для исследованных в работе модельных оцДНК предел чувствительности ДРС метода составляет менее 10 пМ. Кроме того, метод ДРС позволяет детектировать точечные мутации в коротких оцДНК [29].

*Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проекты № 16-02-00054, 16-52-45026, 17-02-00075). Исследования В. А. Ханадеева поддержаны грантом Президента РФ для поддержки молодых российских ученых-кандидатов наук (проект № МК-2617.2017.2).*

## Список литературы

1. Berne B. J., Pecora R. *Dynamic Light Scattering with Applications to Chemistry, Biology, and Physics*. Mineola, N.Y. : Dover Publ., 2000. 384 p.
2. Roebben G., Ramirez-Garcia S., Hackley V. A., Roesslein M., Klaessig F., Kestens V., Lynch I., Garner C. M., Rawle A., Elder A., Colvin V. L., Kreyling W., Krug H. F., Lewicka, Z. A., McNeil S., Nel A., Patri A., Wick P., Wiesner M., Xia T., Oberdörster G., Dawson K. A. Interlaboratory comparison of size and surface charge measurements on nanoparticles prior to biological impact assessment // *J. Nanopart. Res.* 2011. Vol. 13. P. 2675–2687.
3. Speed D., Westerhoff P., Sierra-Alvarez R., Draper R., Pantano P., Aravamudhan S., Chen K. L., Hristovski K., Herckes P., Bi X., Yang Y., Zeng C., Otero-Gonzalez L., Mikoryak C., Wilson B. A., Kosaraju K., Tarannum M., Crawford S., Yi P., Liu X., Babu S. V., Moinpour M., Ranville J., Montano M., Corredor C., Posner J., Shadman F. Physical, chemical, and *in vitro* toxicological characterization of nanoparticles in chemical mechanical planarization suspensions used in the semiconductor industry : Towards environmental health and safety assessments // *Environ. Sci. : Nano.* 2015. Vol. 2. P. 227–244.
4. Gambinossi F., Mylon S. E., Ferri J. K. Aggregation kinetics and colloidal stability of functionalized nanoparticles // *Adv. Colloid Interfac.* 2015. Vol. 222. P. 332–349.
5. Zhu X., Li J., He H., Huang M., Zhang X., Wang S. Application of nanomaterials in the bioanalytical detection of disease-related genes // *Biosens. Bioelectron.* 2015. Vol. 74. P. 113–133.
6. Zheng T., Bott S., Huo Q. Techniques for accurate sizing of gold nanoparticles using dynamic light scattering with particular application to chemical and biological sensing based on aggregate formation // *ACS Appl. Mater. Inter.* 2016. Vol. 8. P. 21585–21594.
7. Siddiqi K. S., Husen A. Recent advances in plant-mediated engineered gold nanoparticles and their application in biological system // *J. Trace Elem. Med. Bio.* 2017. Vol. 40. P. 10–23.
8. Дыкман Л. А., Богатырев В. А., Щеголев С. Ю., Хлебцов Н. Г. Золотые наночастицы : Синтез, свойства, биомедицинское применение. М. : Наука, 2008. 319 с.
9. Khlebtsov N. G., Dykman L. A. Optical properties and biomedical applications of plasmonic nanoparticles // *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transfer.* 2010. Vol. 111. P. 1–35.
10. Dykman L., Khlebtsov N. Gold nanoparticles in biomedical applications : Recent advances and perspectives // *Chem. Soc. Rev.* 2012. Vol. 41. P. 2256–2282.
11. Khlebtsov N. G., Bogatyrev V. A., Dykman L. A., Khlebtsov B. N., Englebienne P. A multilayer model for gold nanoparticle bioconjugates : application to study of gelatin and human IgG adsorption using extinction and light scattering spectra and the dynamic light scattering method // *Colloid J.* 2003. Vol. 65. P. 622–635.
12. Jans H., Liu X., Austin L., Maes G., Huo Q. Dynamic light scattering as a powerful tool for gold nanoparticle bioconjugation and biomolecular binding studies // *Anal. Chem.* 2009. Vol. 81. P. 9425–9432.
13. Kalluri J. R., Arbneshi T., Khan S. A., Neely A., Candice P., Varisli B. Use of gold nanoparticles in a simple colorimetric and ultrasensitive dynamic light scattering assay : Selective detection of arsenic in groundwater // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2009. Vol. 48. P. 9668–9671.
14. Bell N. C., Minelli C., Shard A. G. Quantitation of IgG protein adsorption to gold nanoparticles using particle size measurement // *Anal. Methods.* 2013. Vol. 5. P. 4591–4601.
15. Alex S. A., Chakraborty D., Chandrasekaran N., Mukherjee A. A comprehensive investigation of the differential interaction of human serum albumin with gold nanoparticles based on the variation in morphology and surface functionalization // *RSC Adv.* 2016. Vol. 6. P. 52683–52694.
16. Sutariya P. G., Pandya A., Lodha A., Menon S. K. A simple and rapid creatinine sensing via DLS selectivity,



- using calix[4]arene thiol functionalized gold nanoparticles // *Talanta*. 2016. Vol. 147. P. 590–597.
17. Liu X., Huo Q. A washing-free and amplification-free one-step homogeneous assay for protein detection using gold nanoparticle probes and dynamic light scattering // *J. Immunol. Methods*. 2009. Vol. 349. P. 38–44.
  18. Miao X., Zou S., Zhang H., Ling L. Highly sensitive carcinoembryonic antigen detection using Ag@Au core-shell nanoparticles and dynamic light scattering // *Sensor. Actuat. B-Chem.* 2014. Vol. 191. P. 396–400.
  19. Witten K. G., Bretschneider J. C., Eckert T., Richtering W., Simon U. Assembly of DNA-functionalized gold nanoparticles studied by UV/Vis-spectroscopy and dynamic light scattering // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2008. Vol. 10. P. 1870–1875.
  20. Dynamic Light Scattering (DLS), Malvern, UK. URL: <http://www.malvern.com/en/products/technology/dynamic-light-scattering/default.aspx> (дата обращения: 4.01.17).
  21. Khlebtsov B. N., Khlebtsov N. G. On the measurement of gold nanoparticle sizes by the dynamic light scattering method // *Colloid J.* 2011. Vol. 73. P. 118–127.
  22. Хлебцов Б. Н., Ханадеев В. А., Пылаев Т. Е., Хлебцов Н. Г. Метод динамического рассеяния света в исследованиях силикатных и золотых наночастиц // *Изв. Сарат. ун-та. Нов. сер. Сер. Физика*. 2017. Т. 17, вып. 2. С. 71–84. DOI: 10.18500/1817-3020-2017-17-2-71-84.
  23. Khlebtsov B. N., Khanadeev V. A., Khlebtsov N. G. Determination of the size, concentration, and refractive index of silica nanoparticles from turbidity spectra // *Langmuir*. 2008. Vol. 24. P. 8964–8970.
  24. Khanadeev V. A., Khlebtsov B. N., Khlebtsov N. G. Optical properties of gold nanoshells on monodisperse silica cores : experiment and simulations // *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transfer*. 2017. Vol. 187. P. 1–9.
  25. Khlebtsov N. G., Bogatyrev V. A., Dykman L. A., Melnikov A. G. Spectral extinction of colloidal gold and its biospecific conjugates // *J. Colloid Interface Sci.* 1996. Vol. 180. P. 436–445.
  26. Haiss W., Thanh N. T. K., Aveyard J., Fernig D. G. Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV-Vis spectra // *Anal. Chem.* 2007. Vol. 79. P. 4215–4221.
  27. Njoki P. N., Lim I.-I. S., Mott D., Park H.-Y., Khan B., Mishra S., Sujakumar R., Luo J., Zhong C.-J. Size correlation of optical and spectroscopic properties for gold nanoparticles // *J. Phys. Chem. B.* 2007. Vol. 111. P. 14664–14669.
  28. Khlebtsov N. G. Determination of size and concentration of gold nanoparticles from extinction spectra // *Anal. Chem.* 2008. Vol. 80. P. 6620–6625.
  29. Pylaev T., Khanadeev V., Khlebtsov B., Dykman L., Bogatyrev V., Khlebtsov N. Colorimetric and dynamic light scattering detection of DNA sequences by using positively charged gold nanorods and nanospheres : A comparative study // *Nanotechnology*. 2011. Vol. 22. P. 285501 (11 p).
  30. Amendola V., Meneghetti M. Size evaluation of gold nanoparticles by UV-vis spectroscopy // *J. Phys. Chem. C*. 2009. Vol. 113. P. 4277–4285.
  31. Chithrani B. D., Ghazani A. A., Chan W. C. W. Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells // *Nano Lett.* 2006. Vol. 6. P. 662–668.
  32. Scaffardi L. B., Tocho J. O. Size dependence of refractive index of gold nanoparticles // *Nanotechnology*. 2006. Vol. 17. P. 1309.
  33. Sancho-Parramon J. Surface plasmon resonance broadening of metallic particles in the quasi-static approximation : a numerical study of size confinement and interparticle interaction effects // *Nanotechnology*. 2009. Vol. 20. P. 235706.
  34. Maltsev V. P., Chernyshev A. V., Semyanov K. A., Soini E. Absolute real-time measurement of particle size distribution with the flying light-scattering indicatrix method // *Appl. Opt.* 1996. Vol. 35. P. 3275.
  35. Shifrin K. S., Tonna G. Inverse problems related to light scattering in the atmosphere and ocean // *Advances in Geophysics*. N.Y. : Academic Press, 1993. Vol. 34. P. 175–252.
  36. Khlebtsov B. N., Bogatyrev V. A., Dykman L. A., Khlebtsov N. G. Spectra of resonance light scattering of gold nanoshells : effects of polydispersity and limited electron free path // *Opt. Spectrosc.* 2007. Vol. 102. P. 233–241.
  37. Van der Zande B. M. I., Dhont Jan K. G., Bohmer Marcel R., Philippe A. P. Colloidal dispersions of gold rods characterized by dynamic light scattering and electrophoresis // *Langmuir*. 2000. Vol. 16. P. 459–464.
  38. Rodríguez-Fernández J., Pérez-Juste J., Liz-Marzán L. M., Lang P. R. Dynamic light scattering of short Au rods with low aspect ratios // *J. Phys. Chem. C*. 2007. Vol. 111. P. 5020–5025.
  39. Khlebtsov N. G. On the dependence of the light scattering intensity on the averaged size of polydisperse particles : comments on the paper by M. S. Dyuzheva *et al.* (*Colloid J.* 2002, vol. 64, no. 1, p. 39) // *Colloid J.* 2003. Vol. 65, № 5. P. 652–655.
  40. Klyubin V. V., Bungov V. N. A comparison of results obtained by solution of the inverse problem of correlation spectroscopy with the use of the CONTIN and KLUB packages // *Colloid J.* 1998. Vol. 60. P. 313–318.
  41. Khlebtsov N. G., Bogatyrev V. A., Dykman L. A., Khlebtsov B. N., Krasnov Ya. M. Differential light scattering spectroscopy : a new approach to studies of colloidal gold nanosensors // *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transfer*. 2004. Vol. 89. P. 133–142.
  42. Bogatyrev V. A., Dykman L. A., Khlebtsov B. N., Khlebtsov N. G. Measurement of mean size and evaluation of polydispersity of gold nanoparticles from spectra of optical absorption and scattering // *Opt. Spectrosc.* 2004. Vol. 96. P. 128–135.
  43. Khlebtsov B. N., Zharov V. P., Melnikov A. G., Tuchin V. V., Khlebtsov N. G. Optical amplification of photothermal therapy with gold nanoparticles and nanoclusters // *Nanotechnology*. 2006. Vol. 17. P. 5167–5179.
  44. He W., Huang C. Z., Li Y. F., Xie J. P., Yang R. G., Zhou P. F., Wang J. One-step label-free optical genosens-



- ing system for sequence-specific DNA related to the human immunodeficiency virus based on the measurements of light scattering signals of gold nanorods // *Anal. Chem.* 2008. Vol. 80. P. 8424–8430.
45. *Darbha G. K., Ra U. S., Singh A. K., Ray P. C.* Gold nanorod based sensing of sequence specific HIV-1 virus DNA using hyper Rayleigh scattering spectroscopy // *Chem. Eur. J.* 2008. Vol. 14. P. 3896–3903.
46. *Ma Z., Tian L., Wang T., Wang C.* Optical DNA detection based on gold nanorods aggregation // *Anal. Chim. Acta.* 2010. Vol. 673. P. 179–184.

#### Образец для цитирования:

*Хлебцов Б. Н., Пылаев Т. Е., Ханадеев В. А., Хлебцов Н. Г.* Применение спектроскопии поглощения и динамического рассеяния света в исследованиях систем золотых наночастиц + ДНК // *Изв. Сарат. ун-та. Нов. сер. Сер. Физика.* 2017. Т. 17, вып. 3. С. 136–149. DOI: 10.18500/1817-3020-2017-17-3-136-149.

#### Application of Dynamic Light Scattering and Absorption Spectroscopy to Studies of Systems with Colloidal Gold Nanoparticles + DNA

**B. N. Khlebtsov, T. E. Pylaev,  
V. A. Khanadeev, N. G. Khlebtsov**

Boris N. Khlebtsov, ORCID 0000-0003-3996-5750, Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, 13, Prospekt Entuziastov, Saratov, 410049, Russia, khlebtsov\_b@ibppm.ru

Timofey E. Pylaev, ORCID 0000-0002-2701-3333, Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, 13, Prospekt Entuziastov, Saratov, 410049, Russia, pylaev\_t@ibppm.ru

Vitaly A. Khanadeev, ORCID 0000-0003-3404-5402, Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, 13, Prospekt Entuziastov, Saratov, 410049, Russia, khanadeev\_v@ibppm.ru

Nikolai G. Khlebtsov, ORCID 0000-0002-2055-7784, Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, 13, Prospekt Entuziastov, Saratov, 410049, Russia, khlebtsov@ibppm.ru

**Background and Objectives:** The dynamic light scattering (DLS) method is widely used to evaluate the particle size distributions. However, DLS is not free of serious drawbacks. For a fast approximate estimation of the average size of colloidal gold nanoparticles (AuNPs) within the range of 15–100 nm reasonable results can be obtained with using the absorption spectroscopy. We discuss the advantages and drawbacks of DLS, transmission electron microscope (TEM), and absorption spectroscopy in gold nanoparticle sizing. In addition, we consider the application DLS and absorption spectroscopy to detection of ssDNA oligonucleotides and mismatches in their sequences with using AuNPs. The method principle is as follows: the addition of probe and target ssDNA to CTAB-coated AuNPs results in particle aggregation, whereas no aggregation occurs after addition of probe and nontarget DNA sequences. **Materials and Methods:** 16-nm and 60-nm AuNPs with negative charges were synthesized by the Frens method. Positively charged AuNPs were obtained by functionalization of with CTAB. As ssDNA models, we used 21-mer oligonucleotides from the human immunodeficiency virus HIV-1 and a 23-mer ssDNAs from the *Bacillus anthracis* genes. A Zetasizer Nano ZS instrument (Malvern, UK) was used for DLS measurements. A Libra-120 transmission electron microscope (Carl Zeiss,

Jena, Germany) and a Specord BS 250 spectrophotometer (Analytik Jena, Germany) were used for TEM and spectroscopic measurements at the Simbioz Center for the Collective Use of Research Equipment in the Field of Physical-Chemical Biology and Nanobiotechnology at the IBPPM RAS. **Results:** For a fast estimation of the average size of AuNPs in the range of 15–100 nm, the absorption spectroscopy gives reasonable sizes derived from presented calibrations. For AuNPs with diameters in the range of 3–15 nm, the sizing calibration curve is based on the measurement of the ratio between the absorption intensities at the plasmon resonance wavelength and at 450 nm. We also have demonstrated the application of absorption spectroscopy and DLS methods to estimation of ssDNA concentration.

**Conclusion:** The advantages and drawbacks of three methods (TEM, DLS, and absorption spectroscopy) in nanoparticle sizing have been discussed with a special attention to AuNPs. For spherical particles, the z-average DLS size of AuNPs is in a reasonable agreement with TEM data, whereas the size distribution obtained with DLS is typically much broader than that derived from TEM histograms. DLS is shown to be the only method suitable for nonperturbative and sensitive diagnostics of relatively slow aggregation processes with characteristic times about 1 min. The detection limits of absorption spectroscopy and DLS for ssDNA detection are 100 and 10 pM, respectively.

**Key words:** silica nanoparticles, gold nanoparticles, particle size distribution, dynamic light scattering, electron microscopy, absorption spectroscopy, oligonucleotides, nanoparticle aggregation.

**Acknowledgements:** This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (projects nos. 16-02-00054, 16-52-45026, and 17-02-00075). The work by Vitaly A. Khanadeev was also supported by a grant from the President of Russian Federation (project no. MK-2617.2017.2).

#### References

- Berne B. J., Pecora R. *Dynamic Light Scattering with Applications to Chemistry, Biology, and Physics.* Minerva, New York, Dover Publ., 2000. 384 p.
- Roebben G., Ramirez-Garcia S., Hackley V. A., Roesslein M., Klaessig F., Kestens V., Lynch I., Garner C. M., Rawle A., Elder A., Colvin V. L., Kreyling W., Krug H. F., Lewicka, Z. A., McNeil S., Nel A., Patri A., Wick P., Wiesner M., Xia T., Oberdörster G., Dawson K. A. Interlaboratory comparison of size and surface charge measurements on nanoparticles prior to biological impact assessment. *J. Nanopart. Res.*, 2011, vol. 13, pp. 2675–2687.





3. Speed D., Westerhoff P., Sierra-Alvarez R., Draper R., Pantano P., Aravamudhan S., Chen K. L., Hristovski K., Herckes P., Bi X., Yang Y., Zeng C., Otero-Gonzalez L., Mikoryak C., Wilson B. A., Kosaraju K., Tarannum M., Crawford S., Yi P., Liu X., Babu S. V., Moinpour M., Ranville J., Montano M., Corredor C., Posner J., Shadman F. Physical, chemical, and *in vitro* toxicological characterization of nanoparticles in chemical mechanical planarization suspensions used in the semiconductor industry: Towards environmental health and safety assessments. *Environ. Sci.: Nano*, 2015, vol. 2, pp. 227–244.
4. Gambinossi F., Mylon S. E., Ferri J. K. Aggregation kinetics and colloidal stability of functionalized nanoparticles. *Adv. Colloid. Interfac.*, 2015, vol. 222, pp. 332–349.
5. Zhu X., Li J., He H., Huang M., Zhang X., Wang S. Application of nanomaterials in the bioanalytical detection of disease-related genes. *Biosens. Bioelectron.*, 2015, vol. 74, pp. 113–133.
6. Zheng T., Bott S., Huo Q. Techniques for accurate sizing of gold nanoparticles using dynamic light scattering with particular application to chemical and biological sensing based on aggregate formation. *ACS Appl. Mater. Inter.*, 2016, vol. 8, pp. 21585–21594.
7. Siddiqi K. S., Husen A. Recent advances in plant-mediated engineered gold nanoparticles and their application in biological system. *J. Trace Elem. Med. Bio.*, 2017, vol. 40, pp. 10–23.
8. Dykman L. A., Bogatyrev V. A., Shchyogolev S. Yu., Khlebtsov N. G. *Zolotyie nanochastitsy: Sintez, svoystva, biomeditsinskoe primeneniye* [Gold Nanoparticles. Synthesis, Properties, and Biomedical Applications]. Moscow, Nauka Publ., 2008. 319 p. (in Russian).
9. Khlebtsov N. G., Dykman L. A. Optical properties and biomedical applications of plasmonic nanoparticles. *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transfer.*, 2010, vol. 111, pp. 1–35.
10. Dykman L., Khlebtsov N. Gold nanoparticles in biomedical applications: Recent advances and perspectives. *Chem. Soc. Rev.*, 2012, vol. 41, pp. 2256–2282.
11. Khlebtsov N. G., Bogatyrev V. A., Dykman L. A., Khlebtsov B. N., Englebienne P. A multilayer model for gold nanoparticle bioconjugates: application to study of gelatin and human IgG adsorption using extinction and light scattering spectra and the dynamic light scattering method. *Colloid J.*, 2003, vol. 65, pp. 622–635.
12. Jans H., Liu X., Austin L., Maes G., Huo Q. Dynamic light scattering as a powerful tool for gold nanoparticle bioconjugation and biomolecular binding studies. *Anal. Chem.*, 2009, vol. 81, pp. 9425–9432.
13. Kalluri J. R., Arbneshi T., Khan S. A., Neely A., Candice P., Varisli B. Use of gold nanoparticles in a simple colorimetric and ultrasensitive dynamic light scattering assay: Selective detection of arsenic in groundwater. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2009, vol. 48, pp. 9668–9671.
14. Bell N. C., Minelli C., Shard A. G. Quantitation of IgG protein adsorption to gold nanoparticles using particle size measurement. *Anal. Methods*, 2013, vol. 5, pp. 4591–4601.
15. Alex S. A., Chakraborty D., Chandrasekaran N., Mukherjee A. A. comprehensive investigation of the differential interaction of human serum albumin with gold nanoparticles based on the variation in morphology and surface functionalization. *RSC Adv.*, 2016, vol. 6, pp. 52683–52694.
16. Sutariya P. G., Pandya A., Lodha A., Menon S. K. A simple and rapid creatinine sensing via DLS selectivity, using calix[4]arene thiol functionalized gold nanoparticles. *Talanta*, 2016, vol. 147, pp. 590–597.
17. Liu X., Huo Q. A washing-free and amplification-free one-step homogeneous assay for protein detection using gold nanoparticle probes and dynamic light scattering. *J. Immunol. Methods*, 2009, vol. 349, pp. 38–44.
18. Miao X., Zou S., Zhang H., Ling L. Highly sensitive carcinoembryonic antigen detection using Ag@Au core-shell nanoparticles and dynamic light scattering. *Sensor. Actuat. B-Chem.*, 2014, vol. 191, pp. 396–400.
19. Witten K. G., Bretschneider J. C., Eckert T., Richtering W., Simon U. Assembly of DNA-functionalized gold nanoparticles studied by UV/Vis-spectroscopy and dynamic light scattering. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2008, vol. 10, pp. 1870–1875.
20. *Dynamic Light Scattering (DLS)*, Malvern, UK. Available at: <http://www.malvern.com/en/products/technology/dynamic-light-scattering/default.aspx> (accessed 04 January 2017).
21. Khlebtsov B. N., Khlebtsov N. G. On the measurement of gold nanoparticle sizes by the dynamic light scattering method. *Colloid J.*, 2011, vol. 73, pp. 118–127.
22. Khlebtsov B. N., Khanadeev V. A., Pylaev T. E., Khlebtsov N. G. Dynamic Light Scattering Method in Studies of Silica and Gold Nanoparticles. *Izv. Saratov Univ. (N.S.), Ser. Physics*, 2017, vol. 17, iss. 2, pp. 71–84 (in Russian). DOI: 10.18500/1817-3020-2017-17-2-71-84.
23. Khlebtsov B. N., Khanadeev V. A., Khlebtsov N. G. Determination of the size, concentration, and refractive index of silica nanoparticles from turbidity spectra. *Langmuir*, 2008, vol. 24, pp. 8964–8970.
24. Khanadeev V. A., Khlebtsov B. N., Khlebtsov N. G. Optical properties of gold nanoshells on monodisperse silica cores: experiment and simulations. *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transfer.*, 2017, vol. 187, pp. 1–9.
25. Khlebtsov N. G., Bogatyrev V. A., Dykman L. A., Melnikov A. G. Spectral extinction of colloidal gold and its biospecific conjugates. *J. Colloid Interface Sci.*, 1996, vol. 180, pp. 436–445.
26. Haiss W., Thanh N. T. K., Aveyard J., Fernig D. G. Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV-Vis spectra. *Anal. Chem.*, 2007, vol. 79, pp. 4215–4221.
27. Njoki P. N., Lim I.-I. S., Mott D., Park H.-Y., Khan B., Mishra S., Sujakumar R., Luo J., Zhong C.-J. Size correlation of optical and spectroscopic properties for gold nanoparticles. *J. Phys. Chem. B*, 2007, vol. 111, pp. 14664–14669.
28. Khlebtsov N. G. Determination of size and concentration of gold nanoparticles from extinction spectra. *Anal. Chem.*, 2008, vol. 80, pp. 6620–6625.





29. Pylaev T., Khanadeev V., Khlebtsov B., Dykman L., Bogatyrev V., Khlebtsov N. Colorimetric and dynamic light scattering detection of DNA sequences by using positively charged gold nanorods and nanospheres: A comparative study. *Nanotechnology*, 2011, vol. 22, p. 285501 (11 pp).
30. Amendola V., Meneghetti M. Size evaluation of gold nanoparticles by UV-vis spectroscopy. *J. Phys. Chem. C*, 2009, vol. 113, pp. 4277–4285.
31. Chithrani B. D., Ghazani A. A., Chan W. C. W. Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. *Nano Lett.*, 2006, vol. 6, pp. 662–668.
32. Scaffardi L. B., Tocho J. O. Size dependence of refractive index of gold nanoparticles. *Nanotechnology*, 2006, vol. 17, p. 1309–1315.
33. Sancho-Parramon J. Surface plasmon resonance broadening of metallic particles in the quasi-static approximation: a numerical study of size confinement and interparticle interaction effects. *Nanotechnology*, 2009, vol. 20, p. 235706 (7 pp).
34. Maltsev V. P., Chernyshev A. V., Semyanov K. A., Soini E. Absolute real-time measurement of particle size distribution with the flying light-scattering indicatrix method. *Appl. Opt.*, 1996, vol. 35, pp. 3275–3280.
35. Shifrin K. S., Tonna G. Inverse problems related to light scattering in the atmosphere and ocean. *Advances in Geophysics*. New York, Academic Press, 1993, vol. 34, pp. 175–252.
36. Khlebtsov B. N., Bogatyrev V. A., Dykman L. A., Khlebtsov N. G. Spectra of resonance light scattering of gold nanoshells: effects of polydispersity and limited electron free path. *Opt. Spectrosc.*, 2007, vol. 102, pp. 233–241.
37. Van der Zande B. M. I., Dhont Jan K. G., Bohmer Marcel R., Philipse A. P. Colloidal dispersions of gold rods characterized by dynamic light scattering and electrophoresis. *Langmuir*, 2000, vol. 16, pp. 459–464.
38. Rodríguez-Fernández J., Pérez-Juste J., Liz-Marzán L. M., Lang P. R. Dynamic light scattering of short Au rods with low aspect ratios. *J. Phys. Chem. C*, 2007, vol. 111, pp. 5020–5025.
39. Khlebtsov N. G. On the dependence of the light scattering intensity on the averaged size of polydisperse particles: comments on the paper by M. S. Dyuzheva *et al.* (*Colloid J.*, 2002, vol. 64, no. 1, p. 39). *Colloid J.*, 2003, vol. 65, no. 5, pp. 652–655.
40. Klyubin V. V., Bungov V. N. A comparison of results obtained by solution of the inverse problem of correlation spectroscopy with the use of the CONTIN and KLUB packages. *Colloid J.*, 1998, vol. 60, pp. 313–318.
41. Khlebtsov N. G., Bogatyrev V. A., Dykman L. A., Khlebtsov B. N., Krasnov Ya. M. Differential light scattering spectroscopy: a new approach to studies of colloidal gold nanosensors. *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transfer.*, 2004, vol. 89, pp. 133–142.
42. Bogatyrev V. A., Dykman L. A., Khlebtsov B. N., Khlebtsov N. G. Measurement of mean size and evaluation of polydispersity of gold nanoparticles from spectra of optical absorption and scattering. *Opt. Spectrosc.*, 2004, vol. 96, pp. 128–135.
43. Khlebtsov B. N., Zharov V. P., Melnikov A. G., Tuchin V. V., Khlebtsov N. G. Optical amplification of photothermal therapy with gold nanoparticles and nanoclusters. *Nanotechnology*, 2006, vol. 17, pp. 5167–5179.
44. He W., Huang C. Z., Li Y. F., Xie J. P., Yang R. G., Zhou P. F., Wang J. One-step label-free optical genosensing system for sequence-specific DNA related to the human immunodeficiency virus based on the measurements of light scattering signals of gold nanorods. *Anal. Chem.*, 2008, vol. 80, pp. 8424–8430.
45. Darbha G. K., Ra U. S., Singh A. K., Ray P. C. Gold nanorod based sensing of sequence specific HIV-1 virus DNA using hyper Rayleigh scattering spectroscopy. *Chem. Eur. J.*, 2008, vol. 14, pp. 3896–3903.
46. Ma Z., Tian L., Wang T., Wang C. Optical DNA detection based on gold nanorods aggregation. *Anal. Chim. Acta*, 2010, vol. 673, pp. 179–184.

---

**Cite this article as:**

Khlebtsov B. N., Pylaev T. E., Khanadeev V. A., Khlebtsov N. G. Application of Dynamic Light Scattering and Absorption Spectroscopy to Studies of Systems with Colloidal Gold Nanoparticles + DNA. *Izv. Saratov Univ. (N.S.), Ser. Physics*, 2017, vol. 17, iss. 3, pp. 136–149 (in Russian). DOI: 10.18500/1817-3020-2017-17-3-136-149.

---



## БИОФИЗИКА И МЕДИЦИНСКАЯ ФИЗИКА

УДК 535.4

### УЛУЧШЕННЫЙ АЛГОРИТМ ОБРАБОТКИ ДАННЫХ ДЛЯ ЛАЗЕРНОЙ ЭКТАЦИТОМЕТРИИ ЭРИТРОЦИТОВ

С. Ю. Никитин, В. Д. Устинов, Е. Г. Цыбров, А. В. Приезжев

Никитин Сергей Юрьевич, доктор физико-математических наук, доцент кафедры общей физики и волновых процессов; научный сотрудник, Международный лазерный центр, Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, sergeynikitin007@yandex.ru

Устинов Владислав Дмитриевич, младший научный сотрудник кафедры математической физики; младший научный сотрудник, Международный лазерный центр, Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, vladustinov90@gmail.com

Цыбров Евгений Германович, студент кафедры математической физики, Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, tsybrovevgeniy@yandex.ru

Приезжев Александр Васильевич, кандидат физико-математических наук, доцент кафедры общей физики и волновых процессов; научный сотрудник, Международный лазерный центр, Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, avr2@mail.ru

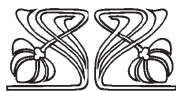
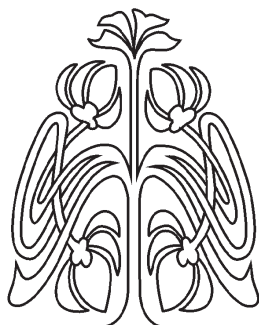
Рассматривается проблема измерения деформируемости эритроцитов методом лазерной дифрактометрии в сдвиговом потоке (эктацитометрии). Проведен углубленный теоретический анализ рассеяния лазерного пучка на неоднородном ансамбле частиц, моделирующих эритроциты в сдвиговом потоке лазерного эктацитометра. Выведены новые дифрактометрические уравнения, которые связывают характеристики ансамбля эритроцитов с параметрами наблюдаемой дифракционной картины. Представлен новый алгоритм обработки данных, позволяющий измерять среднюю деформируемость, а также ширину и асимметрию распределения эритроцитов по деформируемости в исследуемом образце крови. Работа нового алгоритма проверена методом численного моделирования на примере бимодального по деформируемости ансамбля эритроцитов. Показано, что новый алгоритм обеспечивает более высокую точность измерения по сравнению с алгоритмом, разработанным авторами ранее.

**Ключевые слова:** деформируемость эритроцитов, неоднородный ансамбль, сдвиговый поток, лазерная дифрактометрия, алгоритмы обработки данных.

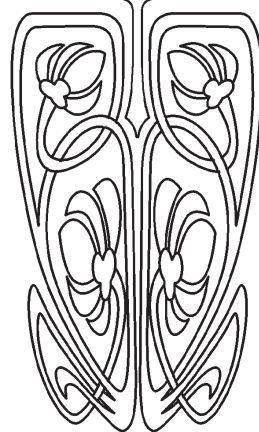
DOI: 10.18500/1817-3020-2017-17-3-150-157

#### Введение

Одной из актуальных проблем медицинской диагностики является проблема измерения деформируемости эритроцитов. Под деформируемостью понимают меру способности клеток крови изменять свою форму под действием внешних сил. Деформируемость эритроцитов является одной из основных реологических характеристик крови. Она существенно влияет на эффективную вязкость крови и способность крови проходить по тончайшим сосудам системы кровообращения – капиллярам [1]. Измерение этого параметра важно при диагностике и лечении многих заболеваний,



НАУЧНЫЙ  
ОТДЕЛ





в частности, таких как серповидно-клеточная анемия [2], ишемия [3] и сахарный диабет.

Существуют несколько методов измерения деформируемости эритроцитов [4–6]. Это втягивание эритроцитов в микропипетку, механическая фильтрация, измерения с помощью лазерного пинцета, дифрактометрия эритроцитов в сдвиговом потоке (эктацитометрия). Однако пока эти методы недоступны для широкой клинической практики. Одной из главных остается проблема интерпретации экспериментальных данных. Для ее решения необходима стандартизация процедур измерений [7, 2], а также разработка более совершенных алгоритмов обработки данных. Один из таких алгоритмов, предназначенный для лазерной эктацитометрии эритроцитов, мы предлагаем в настоящей работе. С помощью этого алгоритма можно измерять среднюю деформируемость, а также ширину и асимметрию распределения эритроцитов по деформируемости в исследуемом образце крови. По сравнению с разработанным ранее, этот алгоритм должен обеспечить более высокую точность измерения указанных параметров.

#### **Лазерная эктацитометрия эритроцитов**

Для оценки деформируемости эритроцита необходимо измерить деформацию клетки под действием какой-либо известной внешней силы. В качестве такой силы можно использовать силу вязкого трения, возникающую в сдвиговом потоке жидкости. Эта идея лежит в основе метода лазерной эктацитометрии.

В ротационном эктацитометре разбавленную суспензию эритроцитов заливают в зазор между стенками двух прозрачных коаксиальных стаканов, один из которых неподвижен, а другой может вращаться с заданной угловой скоростью («ячейка Куэтта»). Вращение подвижного стакана вызывает течение жидкости и появление в ней сдвиговых напряжений, которые ориентируют эритроциты определенным образом и вытягивают их в направлении потока [8]. Суспензию просвечивают лазерным пучком и наблюдают картину рассеяния света на эритроцитах. При увеличении скорости вращения подвижного стакана эта картина вытягивается в направлении, перпендикулярном направлению потока. Степень вытягивания дифракционной картины и служит мерой деформации эритроцитов при данном сдвиговом напряжении [9].

Лазерная эктацитометрия эритроцитов была предложена Бессис и Мохандас в 1975 году

[10]. В настоящее время существуют коммерческие приборы, работающие на этом принципе: ЛОРКА (компания Mechatronics, Голландия) [11] и ЛАДЭ (фирма Реомедлаб, Россия) [12]. Достоинство данного метода состоит в том, что он позволяет быстро оценивать деформируемость большого ансамбля эритроцитов. Кроме того, в куэттовском потоке поле сдвиговых напряжений однородно. Это повышает информативность метода и упрощает интерпретацию экспериментальных данных. Недостатком ротационных эктацитометров является необходимость точной механической юстировки ячейки Куэтта, а также тщательной очистки стаканчиков после каждого измерения.

Сходный принцип действия имеет лазерный эктацитометр РЕОСКАН (Rheomeditech, Корея) [13, 14]. В приборе нет движущихся элементов, а сдвиговые напряжения возникают при протекании суспензии эритроцитов по узкому щелевому каналу («пуазейлевский поток»), однако в нем поле сдвиговых напряжений неоднородно, что уменьшает чувствительность прибора к состоянию и свойствам клеток крови. Кроме того, каждое измерение на РЕОСКАНЕ требует применения нового сменного картриджа [15].

Отметим, что в принципе возможны прямые наблюдения деформации эритроцитов в сдвиговом потоке с помощью микроскопа. Для этого необходимо создать поле сдвиговых напряжений в покоящейся суспензии эритроцитов. Это можно сделать, если поместить суспензию между двумя параллельными прозрачными дисками, вращающимися с одинаковыми скоростями в противоположные стороны. Такой метод измерения деформируемости эритроцитов был использован в работе [16] и называется методом реоскопии. Он труден в практической реализации и пока не получил дальнейшего развития. Тем не менее метод реоскопии полезен, поскольку он дает прямую информацию о форме эритроцитов в сдвиговом потоке и может служить для проверки данных, получаемых другими методами.

В настоящей работе мы предлагаем улучшенный алгоритм обработки данных для метода лазерной эктацитометрии эритроцитов, в котором информацию о клетках крови получают путем наблюдения и обработки дифракционных картин.

#### **Теоретическая модель**

Для количественной интерпретации данных лазерной эктацитометрии необходима теоретическая модель, которая связывает характе-



ристики ансамбля эритроцитов с параметрами наблюдаемой дифракционной картины. Такая модель развита и опробована в наших работах [17–21]. Мы моделируем эритроциты плоскими эллиптическими дисками. Эта модель опирается на изображения эритроцитов в сдвиговом потоке, полученные методом реоскопии [16]. Кроме того, как показали наши расчеты, в интересующей нас области экрана наблюдения картины рассеяния лазерного пучка на плоском и двояковогнутом дисках мало отличаются друг от друга [21]. Полуоси эллипсов  $a$  и  $b$  считаем случайными величинами и определяем формулами  $a = a_0 \cdot (1 + \varepsilon)$ ,  $b = b_0 \cdot (1 - \varepsilon)$ . Здесь  $a_0$  и  $b_0$  – средние размеры полуосей,  $\varepsilon$  – случайный параметр (параметр формы эритроцита), среднее значение которого полагаем равным нулю,  $\langle \varepsilon \rangle = 0$ . Характеристиками ансамбля эритроцитов являются величины

$$s = a_0 / b_0, \langle \varepsilon^2 \rangle = \mu, \langle \varepsilon^3 \rangle = \nu. \quad (1)$$

Здесь угловые скобки обозначают усреднение по ансамблю частиц. Эти величины характеризуют среднюю деформируемость ( $s$ ), а также ширину ( $\mu$ ) и асимметрию ( $\nu$ ) распределения эритроцитов по деформируемости. Задача теории заключается в том, чтобы связать параметры (1) с характеристиками дифракционной картины.

Для решения этой задачи мы используем понятие линии изоинтенсивности (ЛИ). Так называют линию на экране наблюдения, на которой интенсивность рассеянного света постоянна. Мы рассматриваем ЛИ, лежащую на периферии центрального максимума дифракционной картины и вводим следующие ее характеристики:

$$f_0 = \frac{1}{4\beta^2} \cdot \frac{I}{I(0)}, \quad D = y_p / x_p, \quad C_1 = \sqrt{x_p / R(x_p)}, \quad (2)$$

$$C_2 = \sqrt{y_p / R(y_p)}.$$

Здесь  $I$  – интенсивность света на данной ЛИ,  $I(0)$  – интенсивность центрального максимума дифракционной картины;  $x_p, y_p$  – координаты полярных точек ЛИ;  $R(x_p), R(y_p)$  – радиусы кривизны ЛИ в полярных точках,  $\beta = -0.4$  – постоянная величина (параметр функции Бесселя). Указанная область (периферия) дифракционной картины традиционно используется в лазерной эктацитометрии эритроцитов. Ее достоинство состоит в высокой чувствительности формы линий изоинтенсивности к параметрам исследуемого образца крови.

На рис. 1 показаны примеры дифракционной картины, линии изоинтенсивности, а также круги кривизны ЛИ в полярных точках.

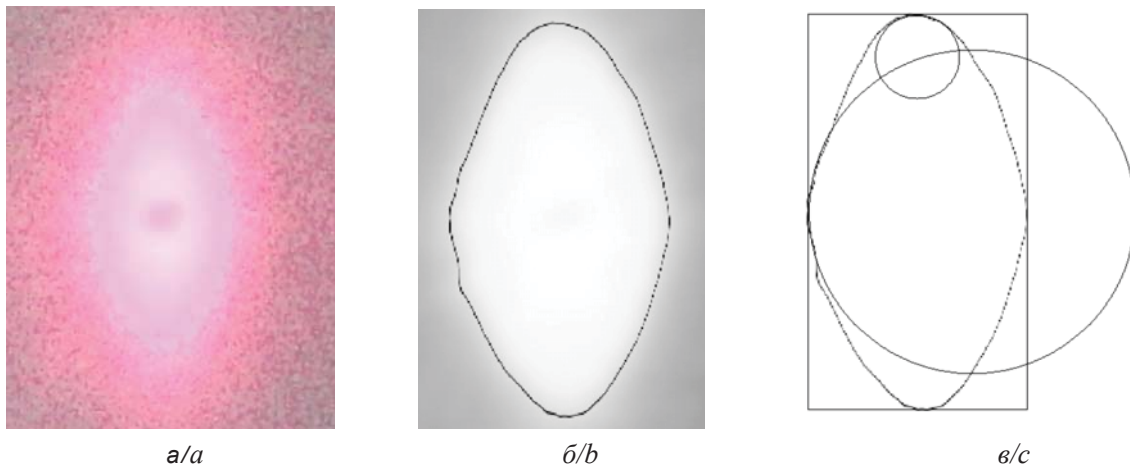


Рис. 1. Дифракционная картина (а), линия изоинтенсивности (б) и круги кривизны линии изоинтенсивности в полярных точках (в)

Fig. 1. Diffraction pattern (a), isointensity line (b) and circles of curvature of the isointensity line at polar points (c)

В работе [18] получено уравнение для формы линии изоинтенсивности. Это уравнение имеет вид  $fr^2 = (1-r)^2 + \mu[H^2 + (r-1)(-2r+3(1-H^2))] + \nu H[-2r+3(1-H^2) - 5(r-1)(1-H^2)]$ . (3)

Здесь  $f = f_0 \cdot (1 - 2\mu)$  и  $H = \cos 2\varphi$ . Полярные координаты  $r$  и  $\varphi$  определяются формулами

$$x = Ar \cos \varphi, \quad y = Br \sin \varphi, \quad (4)$$





$A = \frac{q_1 z}{ka_0}$ ,  $B = \frac{q_1 z}{kb_0}$ . В этих формулах  $x$ ,  $y$  – декар-

товы координаты точки на экране наблюдения в системе координат, начало которой расположено в центре дифракционной картины;  $z$  – расстояние от измерительного объема до экрана наблюдения,  $k = 2\pi / \lambda$  – волновое число,  $\lambda$  – длина световой волны,  $q_1 = 3.82$  – постоянная величина (параметр функции Бесселя). Уравнение (3) справедливо для слабо неоднородного ансамбля частиц, когда  $\mu \ll 1$  и  $|v| \ll 1$ , и для ограниченной части дифракционной картины, лежащей на периферии центрального дифракционного максимума. Эта область определяется условием  $I/I(0) \ll 1$ .

В работе [18] мы рассмотрели приближенный вариант уравнения (3), пренебрегая в правой части этого уравнения слагаемыми, пропорциональными величине  $(r-1)$ . Это приближение применимо для узкой области на экране наблюдения, лежащей вблизи границы центрального дифракционного максимума. В данной работе мы проанализируем полное уравнение (3). Это позволит обобщить теорию на более широкую область дифракционной картины.

Используя соотношения [18]

$$x_p = Ar(0), \quad y_p = Br(\pi/2),$$

$$C_1 = \sqrt{x_p \left| \frac{d^2 x_p}{dy^2} \right|}, \quad C_2 = \sqrt{y_p \left| \frac{d^2 y_p}{dx^2} \right|}$$

и формулы (4), получим:

$$D/s = \frac{r(\pi/2)}{r(0)}, \quad C_1/s = \sqrt{1 - \frac{r''(0)}{r(0)}},$$

$$C_2/s = \sqrt{1 - \frac{r''(\pi/2)}{r(\pi/2)}}, \quad (5)$$

где функция  $r(\varphi)$  определяется уравнением (3). Представим это уравнение в виде

$$\alpha r^2 - 2r \cdot (1+U) + 1+V = 0, \quad (6)$$

где  $\alpha = (1-f_0) \cdot (1-2\mu)$  – постоянная величина, функции  $U = \mu \cdot U_\mu + v \cdot U_v$  и  $V = \mu \cdot V_\mu + v \cdot V_v$  линейны по малым параметрам  $\mu$  и  $v$ , а тригонометрические функции  $U_\mu, U_v, V_\mu, V_v$  определяются формулами

$$U_\mu = \frac{1}{2}(3H^2 - 5), \quad U_v = \frac{1}{2}H \cdot (7 - 5H^2),$$

$$V_\mu = 4H^2 - 3, \quad V_v = 8H \cdot (1 - H^2), \quad H = \cos 2\varphi. \quad (7)$$

Решение уравнения (6) можно представить в виде

$$r(\varphi) = \frac{R(\varphi)}{(1 + \sqrt{f_0})(1 - 2\mu)},$$

где  $R(\varphi) = 1 + \mu R_\mu + v R_v$ ,

$$R_\mu = \frac{1}{2\sqrt{f_0}} \left[ -2U_\mu + (1 + \sqrt{f_0}) \cdot (V_\mu - 2) \right],$$

$$R_v = \frac{1}{2\sqrt{f_0}} \cdot \left[ -2U_v + (1 + \sqrt{f_0}) \cdot V_v \right]. \quad (8)$$

Отсюда  $r''(\varphi) = \frac{R''(\varphi)}{(1 + \sqrt{f_0})(1 - 2\mu)}$ ,

где  $R'' = \mu R''_\mu + v R''_v$  и

$$R''_\mu = \frac{1}{2\sqrt{f_0}} \left[ -2U''_\mu + (1 + \sqrt{f_0}) V''_\mu \right],$$

$$R''_v = \frac{1}{2\sqrt{f_0}} \cdot \left[ -2U''_v + (1 + \sqrt{f_0}) \cdot V''_v \right]. \quad (9)$$

Используя формулы (7), получаем:

$$U''_\mu = 12(1 - 2H^2), \quad U''_v = -2H(7 + 15(2 - 3H^2)),$$

$$V''_\mu = 32(1 - 2H^2), \quad V''_v = -32H(1 + 3(2 - 3H^2)).$$

Подставив эти выражения в формулы (5), получим:

$$D/s = 1 + \mu \cdot [R_\mu(\pi/2) - R_\mu(0)] + v \cdot [R_v(\pi/2) - R_v(0)],$$

$$C_1/s = 1 - \frac{1}{2} R''(0), \quad C_2/s = 1 - \frac{1}{2} R''(\pi/2). \quad (10)$$

Соотношения (10) написаны в линейном по малым параметрам  $\mu$  и  $v$  приближении. Процедура вывода дифрактометрических уравнений показывает, что приближение применимо, если неоднородность ансамбля эритроцитов по деформируемости является достаточно слабой. Математически это условие можно выразить формулой

$$\mu < \frac{1}{2} f_0, \quad (11)$$

где параметры  $\mu$  и  $f_0$  определены формулами (1), (2).

Используя формулы (10), получаем дифрактометрические уравнения:

$$D/s = 1 + v \cdot q_0, \quad C_1/s = 1 + \mu \cdot q_1 - v \cdot q_2,$$

$$C_2/s = 1 + \mu \cdot q_1 + v \cdot q_2, \quad (12)$$

где

$$q_0 = 2/\sqrt{f_0}, \quad q_1 = 8 + \frac{2}{\sqrt{f_0}}, \quad q_2 = 16 + \frac{8}{\sqrt{f_0}}. \quad (13)$$

Таким образом, поставленная задача решена. Уравнения (12), (13) связывают между собой



характеристики ансамбля эритроцитов (1) и параметры дифракционной картины (2).

### Алгоритм обработки данных

Решение уравнений (12) имеет вид [18]

$$s = \frac{Q}{1 + \sqrt{1 - 2QqC_1}}, \quad \mu = \frac{1}{2q_1} \left( \frac{C_2}{s} + C_1s \right) - \frac{1}{q_1},$$

$$v = \frac{1}{2q_2} \left( \frac{C_2}{s} - C_1s \right). \quad (14)$$

где

$$q = q_0 / 2q_2, \quad Q = 2(D - qC_2). \quad (15)$$

Формулы (13)–(15) дают явное выражение искомых характеристик ансамбля эритроцитов (1) через экспериментально измеряемые параметры дифракционной картины (2). Они математически выражают улучшенный алгоритм обработки данных для лазерной эктацитометрии эритроцитов.

Для проверки работы нового алгоритма мы провели численное моделирование рассеяния лазерного пучка на бимодальном ансамбле эритроцитов. Ансамбль представляет собой смесь недеформируемых и деформируемых эритроцитов, находящихся под определенным сдвиговым напряжением. Форма клеток первой компоненты ансамбля характеризуется числом  $s_1$ , второй компоненты – числом  $s_2$ , а доля клеток первого типа – числом  $p$ . На основе этих данных вычисляются характеристики ансамбля  $s, \mu, v$  по формулам [18]

$$s = M + \sqrt{M^2 + s_1s_2}, \quad \mu = p\varepsilon_1^2 + (1-p)\varepsilon_2^2,$$

$$v = p\varepsilon_1^3 + (1-p)\varepsilon_2^3, \quad (16)$$

где

$$M = (s_2 - s_1) \cdot (p - 1/2), \quad s = M + \sqrt{M^2 + s_1s_2},$$

$$\varepsilon_1 = \frac{s_1 - s}{s_1 + s}, \quad \varepsilon_2 = \frac{s_2 - s}{s_2 + s}. \quad (17)$$

Затем строится дифракционная картина по методике, описанной в работе [20], выбирается линия изоинтенсивности, соответствующая определенному числу  $f_0$ , и определяются параметры этой линии  $D, C_1, C_2$ . После этого числа  $s, \mu, v$  вычисляются по формулам (13)–(15). Сравнивая результаты, полученные этими двумя способами, можно оценить точность работы алгоритма.

Приведем пример. Для условий

$$s_1 = 1, \quad s_2 = 2.84, \quad p = 0.2, \quad f_0 = 0.077 \quad (18)$$

мы получили

$$D = 2.23, \quad C_1 = 0.92, \quad C_2 = 2.86. \quad (19)$$

Отсюда по формулам (13)–(15) нашли

$$s = 2.44, \quad \mu = 0.047, \quad v = -0.012. \quad (20)$$

Для этих же условий по формулам (16), (17) получили

$$s = 2.35, \quad \mu = 0.040, \quad v = -0.012. \quad (21)$$

Сравнение результатов (20) и (21) показывает, что алгоритм обработки данных (13)–(15) обеспечивает достаточно высокую точность измерений.

### Обсуждение результатов

Оценивая качество нового алгоритма, целесообразно сравнить получаемые с его помощью результаты с данными алгоритма, предложенного в работах [17, 18]. Работа этого алгоритма описывается теми же формулами (14), (15), однако вместо (13) используется другой набор чисел, а именно

$$q_0 = 2/\sqrt{f_0}, \quad q_1 = \frac{2}{(1 - \sqrt{f_0})\sqrt{f_0}},$$

$$q_2 = \frac{2(4 - \sqrt{f_0})}{(1 - \sqrt{f_0})\sqrt{f_0}}. \quad (22)$$

Сопоставление данных проведем на примере того же бимодального ансамбля, который описывается формулами (18). Подстановка чисел (18) в (22), (14), (15) приводит к следующему результату:

$$s = 2.51, \quad \mu = 0.073, \quad v = -0.016. \quad (23)$$

Сравнивая данные (20), (21) и (23), видим, что новый алгоритм обеспечивает более высокую точность измерений по сравнению с алгоритмом, предложенным в работах [17, 18].

Еще один пример показан на рис. 2. Здесь изображены зависимости параметра  $\mu$ , характеризующего разброс эритроцитов по деформируемости, от относительной интенсивности света на линии изоинтенсивности. Эти зависимости построены путем анализа дифракционных картин для модельного (бимодального) ансамбля эритроцитов, характеризуемого параметрами

$$s_1 = 1, \quad s_2 = 2.5, \quad p = 0.2. \quad (24)$$

Сплошная линия на рис. 2 построена с использованием формул (22). Линия, показанная пунктиром, – с использованием формул (13). Горизонтальная прямая показывает значение параметра  $\mu$ , вычисленное по формулам (16), (17), (24).

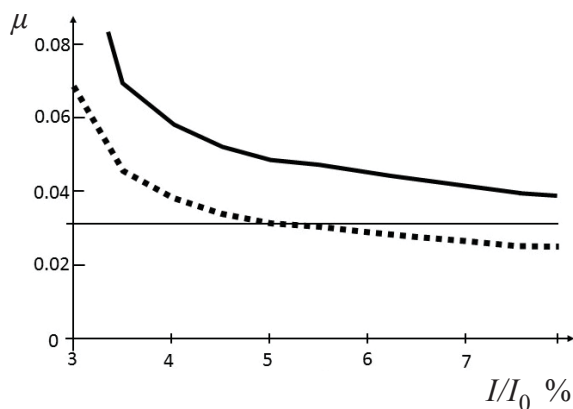


Рис. 2. Параметр  $\mu$ , характеризующий разброс эритроцитов по деформируемости, как функция относительной интенсивности рассеянного света на линии изоинтенсивности. Кривые получены путем анализа дифракционной картины, построенной для модельного (бимодального) ансамбля эритроцитов. Сплошная линия построена с использованием формул (22). Линия, показанная пунктиром, – с использованием формул (13). Горизонтальная прямая показывает значение параметра  $\mu$ , вычисленное по формулам (16), (17), (24)

Fig. 2. Parameter  $\mu$  characterizing the spread of erythrocytes in deformability, as a function of the relative intensity of scattered light at the iso-intensity line. The curves were obtained by analyzing the diffraction pattern constructed for the model (bimodal) ensemble of erythrocytes. The solid line is calculated using formulas (22). The dotted line is calculated using formulas (13). The horizontal line shows the value of the parameter  $\mu$ , calculated from formulas (16), (17), (24)

Этот рисунок демонстрирует преимущество нового алгоритма обработки данных для линий изоинтенсивности, лежащих в широкой области дифракционной картины. Увеличение ошибки измерений в области малых интенсивностей рассеянного света мы связываем с нарушением условия (11).

### Заключение

В настоящей работе рассматривается проблема измерения деформируемости эритроцитов методом лазерной дифрактометрии в сдвиговом потоке (эктацитометрии). Проведен углубленный теоретический анализ рассеяния лазерного пучка на неоднородном ансамбле частиц, моделирующих эритроциты в сдвиговом потоке лазерного эктацитометра. Выведены новые дифрактометрические уравнения, которые связывают характеристики ансамбля эритроцитов с параметрами наблюдаемой дифракционной картины. Представлен новый алгоритм обработки данных, позволяющий измерять среднюю деформируемость, а также ширину и асиммет-

рию распределения эритроцитов по деформируемости в исследуемом образце крови. Работа нового алгоритма проверена методом численного моделирования на примере бимодального по деформируемости ансамбля эритроцитов. Показано, что новый алгоритм обеспечивает более высокую точность измерения по сравнению с алгоритмом, разработанным нами ранее.

### Благодарности

Авторы выражают благодарность Луговцову Андрею Егоровичу за помощь в проведении тестовых экспериментов и обсуждение результатов.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 17-02-00249).

### Список литературы

1. Mokken F. C., Kedaria M., Henny C. P., Hardeman M. R., Gelb A. W. The clinical importance of erythrocyte deformability, a hemorheological parameter // *Annals of Hematology*. 1992. Vol. 64, № 3. P. 113–122.
2. Renoux C., Parrow N., Faes C., Joly P., Hardeman M., Tisdale J., Levine M., Garnier N., Bertrand Y., Kebaili K., Cuzzubbo D., Cannas G., Martin C., Connes P. Importance of methodological standardization for the ektacytometric measures of red blood cell deformability in sickle cell anemia // *Clinical Hemorheology and Microcirculation*. 2016. Vol. 62. P. 173–179. DOI: 10.3233/CH-151979.
3. Ажермачева М. Н., Плотников Д. М., Алиев О. И., Алифирова В. М., Плотников М. Б., Буркова К. И. Реологические свойства крови в острейший период ишемического инсульта и их взаимосвязь со степенью тяжести неврологических нарушений // *Бюл. сибирской медицины*. 2013. Т. 12, № 5. С. 5–12.
4. Musielak M. Red blood cell-deformability measurement : Review of techniques // *Clinical Hemorheology and Microcirculation*. 2009. Vol. 42. P. 47–64. DOI: 10.3233/CH-2009-1187.
5. Kim Yo., Kim K., Park Y. Measurement Techniques for Red Blood Cell Deformability : Recent Advances. Chapter 10 // *Blood Cell – An Overview of Studies in Hematology* / ed. E. Terry Moschandreu. 2012. P. 167–194. DOI: 10.5772/50698.
6. Kim J., Lee H., Shin S. Advances in the measurement of red blood cell deformability : A brief review // *J. of Cell Biol.* 2015. Vol. 1. P. 63–79. DOI: 10.3233/JCB-15007.
7. Baskurt O. K., Boynard M., Cokelet G. C., Connes Ph., Cooke B. M., Forconi S., Liao F., Hardeman M. R., Jung F., Meiselman H. J., Nash G., Nemeth N., Neu B., Sandhagen B., Shin S., Thurston G., Wautier J. New guidelines for hemorheological laboratory techniques // *Clinical Hemorheology and Microcirculation*. 2009. Vol. 42. P. 75–97.
8. Фирсов Н. Н., Приезжев А. В., Климова Н. В., Тюрина А. Ю. Основные закономерности деформацион-



- ного поведения эритроцитов в сдвиговом потоке // Инженерно-физический журн. 2006. Т. 79, № 1. С. 114–120.
9. *Vialiat A., Abkarian M.* Red blood cell : from its mechanics to its motion in shear flow // International Journal of Laboratory Hematology. 2014. Vol. 36. P. 237–243.
  10. *Bessis M., Mohandas N.* A diffractometric method for the measurement of cellular deformability // Blood Cells. 1975. Vol. 1. P. 307–313.
  11. *Hardeman M. R., Goedhart P. T., Dobbe J. G. G., Lettinga K. P.* Laser-assisted optical rotational cell analyzer (LORCA). A new instrument for measurement of various structural hemorheological parameters // Clinical Hemorheology and Microcirculation. 1994. Vol. 14. P. 605–618.
  12. *Фирсов Н. Н., Джанашия П. Х.* Введение в экспериментальную и клиническую гемореологию. М. : Изд-во ГОУ ВПО «РГМУ», 2004. 280 с.
  13. *Shin S., Ku Yu., Park M., Jang J., Suh J.* Rapid cell-deformability sensing system based on slit-flow laser diffractometry with decreasing pressure differential // Biosensors and Bioelectronics. 2005. Vol. 20. P. 1291–1297.
  14. RHEOSCAN. URL: <http://www.rheoscan.com/main/main.html> (дата обращения: 15.01.2017).
  15. *Baskurt O. K., Hardeman M. R., Uyklu M., Ulker P., Cengiz M., Nemeth N., Shin S., Alexy T., Meiselman H. J.* Comparison of three commercially available ektacytometers with different shearing geometries // Biorheology. 2009. Vol. 46. P. 251–264. DOI: 10.3233/BIR-2009-0536.
  16. *Dobbe J. G. G., Hardeman M. R., Streekstra G. J., Starckee J., Ince C., Grimbergen C. A.* Analyzing red blood cell-deformability distributions // Blood Cells, Molecules, and Diseases. 2002. Vol. 28. P. 373.
  17. *Никитин С. Ю., Приезжев А. В., Луговцов А. Е., Устинов В. Д.* Измерение асимметрии распределения эритроцитов по деформируемости методом лазерной эктацитометрии // Квантовая электроника. 2014. Т. 44, № 8. С. 774–778.
  18. *Nikitin S. Yu., Priezzhev A. V., Lugovtsov A. E., Ustinov V. D., Razgulin A. V.* Laser ektacytometry and evaluation of statistical characteristics of inhomogeneous ensembles of red blood cells // JQSRT. 2014. Vol. 146. P. 365–375.
  19. *Nikitin S. Yu., Lugovtsov A. E., Ustinov V. D., Lin M. D., Priezzhev A. V.* Study of laser beam scattering by inhomogeneous ensemble of red blood cells in a shear flow // JIOHS. 2015. Vol. 8. P. 1550031. DOI: 10.1142/S1793545815500315
  20. *Nikitin S. Yu., Ustinov V. D., Yurchuk Yu. S., Lugovtsov A. E., Lin M. D., Priezzhev A. V.* New diffractometric equations and data processing algorithm for laser ektacytometry of red blood cells // JQSRT. 2016. Vol. 178. P. 315–324.
  21. *Nikitin S. Yu., Priezzhev A. V., Lugovtsov A. E.* Analysis of laser beam scattering by an ensemble of particles modeling red blood cells in ektacytometer // JQSRT. 2013. Vol. 121. P. 1–8.

#### Образец для цитирования:

*Никитин С. Ю., Устинов В. Д., Цыбров Е. Г., Приезжев А. В.* Улучшенный алгоритм обработки данных для лазерной эктацитометрии эритроцитов // Изв. Сарат. ун-та. Нов. сер. Сер. Физика. 2017. Т. 17, вып. 3. С. 150–157. DOI: 10.18500/1817-3020-2017-17-3-150-157.

#### Improved Data Processing Algorithm for Laser Ektacytometry of Red Blood Cells

**S. Yu. Nikitin, V. D. Ustinov,  
E. G. Tsybrov, A. V. Priezzhev**

Sergey Yu. Nikitin, ORCID 0000-0002-2396-5724, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory, Moscow, 119991, Russia, sergeynikitin007@yandex.ru

Vladislav D. Ustinov, ORCID 0000-0001-5169-4848, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory, Moscow, 119991, Russia, vladustinov90@gmail.com

Evgeny G. Tsybrov, ORCID 0000-0003-4593-4838, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory, Moscow, 119991, Russia, tsybrovevgeniy@yandex.ru

Alexander V. Priezzhev, ORCID 0000-0003-4216-7653, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory, Moscow, 119991, Russia, avp2@mail.ru

**Background and Objectives:** Red blood cells deliver oxygen to organs and tissues. In case of tropical malaria, blood anemia, diabetes mellitus and many other diseases, the cells become corrupted. These pathologies lead in altering deformability of the cells, i.e ability to change their shape under external forces. Precise measurement of cell's deformability gives important medical information which helps

to cure and monitor the most wide spread diseases more effectively. Thus, to improve the accuracy of modern techniques measuring the deformability of red blood cells is a task of great importance. The goal of this study is to enhance precision of laser diffractometry which is one of the basic tools for analyzing the deformability of red blood cells. **Materials and Methods:** The problem of measuring the deformability of red blood cells by laser diffraction in a shear flow (ektacytometry) is considered. Improved theoretical analysis of the laser beam scattering by inhomogeneous ensemble of particles mimicking red blood cells in a shear flow is performed. **Results:** New diffractometric equations establishing relations between characteristics of red blood cells and parameters of the diffraction pattern were derived. New data processing algorithm is presented for measuring the average deformability, as well as width and asymmetry of the erythrocyte deformability distribution. The numerical simulation of a bimodal ensemble of red blood cells was used for the algorithm verification. **Conclusion:** It has been shown that the new algorithm provides higher cells's deformability measurement accuracy compared to the algorithm developed earlier. **Key words:** erythrocyte deformability, inhomogeneous ensemble, shear flow, laser ektacytometry, data processing algorithm.

**Acknowledgements:** *The authors thank Andrey E. Lugovtsov for the help with test experiments and useful discussion of the results.*

*This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (project no. 17-02-00249).*





## References

- Mokken F. C., Kedaria M., Henny C. P., Hardeman M. R., Gelb A. W. The clinical importance of erythrocyte deformability, a hemorheological parameter. *Annals of Hematology*, 1992, vol. 64, no. 3, pp. 113–122.
- Renoux C., Parrow N., Faes C., Joly P., Hardeman M., Tisdale J., Levine M., Garnier N., Bertrand Y., Kebaili K., Cuzzubbo D., Cannas G., Martin C., Connes P. Importance of methodological standardization for the ektacytometric measures of red blood cell deformability in sickle cell anemia. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 2016, vol. 62, pp. 173–179. DOI: 10.3233/CH-151979.
- Azhermacheva M. N., Plotnikov D. M., Aliev O. I., Alifirova V. M., Plotnikov M. B., Burkova K. I. Reologicheskie svoistva krovi v ostreishii period ishemičeskogo insul'ta i ikh vzaimosviaz' so stepen'iu tiazhesti nevrologičeskikh narushenii [The rheological properties of blood in the most acute stage of ischemic stroke and their relation to the severity of neurological impairment]. *Biulleten' Sibirskoi Meditsiny*, 2013, vol. 12, no. 5, pp. 5–12 (in Russian).
- Musiela M. Red blood cell-deformability measurement: Review of techniques. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 2009, vol. 42, pp. 47–64. DOI: 10.3233/CH-2009-1187.
- Kim Yo., Kim K., Park Y. Measurement Techniques for Red Blood Cell Deformability: Recent Advances. Chapter 10. In: *Blood Cell – An Overview of Studies in Hematology*. Ed. Terry E. Moschandreu. 2012, pp. 167–194. DOI: 10.5772/50698.
- Kim J., Lee H., Shin S. Advances in the measurement of red blood cell deformability: A brief review. *Journal of Cellular Biotechnology*, 2015, vol. 1, pp. 63–79. DOI: 10.3233/JCB-15007.
- Baskurt O. K., Boynard M., Coklet G. C., Connes Ph., Cooke B. M., Forconi S., Liao F., Hardeman M. R., Jung F., Meiselman H. J., Nash G., Nemeth N., Neu B., Sandhagen B., Shin S., Thurston G., Wautier J. New guidelines for hemorheological laboratory techniques. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 2009, vol. 42, pp. 75–97.
- Firsov N. N., Priezzhev A. V., Klimova N. V., Tyurina A. Yu. Fundamental laws of the deformational behavior of erythrocytes in shear flow. *Journal of Engineering Physics and Thermophysics*, 2006, vol. 79, no. 1, pp. 118–124.
- Vialiat A., Abkarian M. Red blood cell: from its mechanics to its motion in shear flow. *International Journal of Laboratory Hematology*, 2014, vol. 36, pp. 237–243.
- Bessis M., Mohandas N. A diffractometric method for the measurement of cellular deformability. *Blood Cells*, 1975, vol. 1, pp. 307–313.
- Hardeman M. R., Goedhart P. T., Dobbe J. G. G., Lettinga K. P. Laser-assisted optical rotational cell analyzer (LORCA). A new instrument for measurement of various structural hemorheological parameters. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 1994, vol. 14, pp. 605–618.
- Firsov N. N., Dzhanashiya P. Kh. *Vvedeniye v eksperimental'nuyu i klinicheskuyu gemoreologiyu* [Introduction to clinical experimental hemorheology]. Moscow, Izd-vo GOU VPO «RGMU» [Russian State Medical University], 2004. 280 p. (in Russian).
- Shin S., Ku Yu., Park M., Jang J., Suh J. Rapid cell-deformability sensing system based on slit-flow laser diffractometry with decreasing pressure differential. *Biosensors and Bioelectronics*, 2005, vol. 20, pp. 1291–1297.
- RHEOSCAN. Available at: <http://www.rheoscan.com/main/main.html> (accessed 15 January 2017).
- Baskurt O. K., Hardeman M. R., Uyuklu M., Ulker P., Cengiz M., Nemeth N., Shin S., Alexy T., Meiselman H. J. Comparison of three commercially available ektacytometers with different shearing geometries. *Biorheology*, 2009, vol. 46, pp. 251–264. DOI: 10.3233/BIR-2009-0536.
- Dobbe J. G. G., Hardeman M. R., Streekstra G. J., Starckee J., Ince C., Grimbergen C. A. Analyzing red blood cell-deformability distributions. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 2002, vol. 28, p. 373.
- Nikitin S. Y., Priezzhev A. V., Lugovtsov A. E., Ustinov V. D. Measuring skewness of red blood cell deformability distribution by laser ektacytometry. *Quantum Electronics*, 2014, vol. 44, no. 8, pp. 774–778.
- Nikitin S. Yu., Priezzhev A. V., Lugovtsov A. E., Ustinov V. D., Razgulin A. V. Laser ektacytometry and evaluation of statistical characteristics of inhomogeneous ensembles of red blood cells. *JQSRT*, 2014, vol. 146, pp. 365–375.
- Nikitin S. Yu., Lugovtsov A. E., Ustinov V. D., Lin M. D., Priezzhev A. V. Study of laser beam scattering by inhomogeneous ensemble of red blood cells in a shear flow. *JIOHS*, 2015, vol. 8, pp. 1550031. DOI: 10.1142/S1793545815500315.
- Nikitin S. Yu., Ustinov V. D., Yurchuk Yu. S., Lugovtsov A. E., Lin M. D., Priezzhev A. V. New diffractometric equations and data processing algorithm for laser ektacytometry of red blood cells. *JQSRT*, 2016, vol. 178, pp. 315–324.
- Nikitin S. Yu., Priezzhev A. V., Lugovtsov A. E. Analysis of laser beam scattering by an ensemble of particles modeling red blood cells in ektacytometer. *JQSRT*, 2013, vol. 121, pp. 1–8.

## Cite this article as:

Nikitin S. Yu., Ustinov V. D., Tsybrov E. G., Priezzhev A. V. Improved Data Processing Algorithm for Laser Ektacytometry of Red Blood Cells. *Izv. Saratov Univ. (N.S.), Ser. Physics*, 2017, vol. 17, iss. 3, pp. 150–157 (in Russian). DOI: 10.18500/1817-3020-2017-17-3-150-157.



УДК 535.36

## ЧИСЛЕННОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ МЕТОДОМ МОНТЕ–КАРЛО РАСПРОСТРАНЕНИЯ ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ В МНОГОСЛОЙНОЙ СРЕДЕ, ИМИТИРУЮЩЕЙ ТКАНИ ГОЛОВЫ В НОРМЕ И ПРИ ВНУТРИЧЕРЕПНОЙ ГЕМАТОМЕ



А. В. Беликов, А. В. Скрипник, М. М. Антропова

Беликов Андрей Вячеславович, доктор физико-математических наук, профессор кафедры лазерных технологий и систем, Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, avbelikov@gmail.com

Скрипник Алексей Владимирович, кандидат физико-математических наук, доцент кафедры лазерных технологий и систем, Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, alesch\_skrupnik@mail.ru

Антропова Мария Михайловна, магистр кафедры лазерных технологий и систем, Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, antropovamm@mail.ru

Разработана оптическая модель тканей головы и головного мозга в норме и при внутричерепной гематоме. Выполнено компьютерное моделирование (по методу Монте–Карло) распространения лазерного излучения с длиной волны 0.730, 0.805 и 0.980 мкм. Обнаружено, что при гематоме в распределении интенсивности рассеянного назад лазерного излучения на поверхности кожи головы формируется «кольцевая» структура. Исследовано влияние толщины кожи головы (скальпа), кости черепа и толщины гематомы на величину разности мощности рассеянного назад лазерного излучения на поверхности кожи головы в норме и при гематоме. Показано, что разность мощности в норме и при наличии гематомы максимальна на длине волны лазерного излучения 0.805 мкм и тем больше, чем меньше толщина кожи головы (скальпа) и кости черепа, а при увеличении толщины гематомы разность мощности рассеянного назад лазерного излучения на поверхности кожи головы в норме и при наличии гематомы нелинейно увеличивается.

**Ключевые слова:** оптическая модель, поглощение, рассеяние, лазерное излучение, гематома, кровь, кожа, череп, серое вещество, белое вещество.

DOI: 10.18500/1817-3020-2017-17-3-158-170

### Введение

Голова и головной мозг в норме состоят из множества тканей, к которым прежде всего следует отнести кожу (скальп), кости черепа, твёрдую, паутинную и мягкую оболочки головного мозга; серое и белое вещества головного мозга [1]. Различают также эпидуральное, субдуральное и субарахноидальное пространства. Эпи-

дуральное пространство располагается между костью черепа и твёрдой мозговой оболочкой. В норме оно отсутствует, так как в области свода и основания черепа твёрдая мозговая оболочка сращена с костью, однако сращение является рыхлым, что делает возможным образование эпидурального пространства при повреждении костей и ушибах. Субдуральное пространство располагается между твёрдой и паутинной мозговыми оболочками. Оно содержит небольшое количество цереброспинальной жидкости (ликвора), которая предохраняет головной мозг от механических воздействий, обеспечивает поддержание постоянного внутричерепного давления и водно-электролитного баланса, поддерживает трофические и обменные процессы между кровью и мозгом [2, 3]. Субарахноидальное пространство отделяет паутинную оболочку от мягкой и также содержит ликвор [2].

Внутричерепная гематома образуется в результате травмы или при разрыве сосудов головного мозга и представляет собой скопление крови в полости черепа [4]. По объёму крови выделяют гематомы: малых (до 50 мл), средних (50–150 мл) и больших объёмов (более 150 мл) [5, 6]. В зависимости от локализации гематомы подразделяются на эпидуральные, субдуральные, внутримозговые и внутримозжечковые. В работе [5] сообщается, что данные виды внутричерепных гематом соотносятся по частоте возникновения следующим образом: 4 : 8 : 3 : 1.

Эпидуральная гематома представляет собой ограниченное скопление крови, располагающееся между внутренней поверхностью костей черепа и твёрдой мозговой оболочкой, т. е. в эпидуральном пространстве. Согласно [7] эпидуральные гематомы составляют 0.6–5.0% всех черепно-мозговых травм. В 73–75% случаев эти гематомы расположены в височной области. Как уже было отмечено, в норме твёрдая мозговая оболочка плотно прилежит к костям черепа и по линии швов сращена с ними, вследствие чего размер эпидуральных гематом ограничен и наиболее



часто составляет 60–80 мм в диаметре. Объём эпидуральной гематомы составляет 80–120 мл. Стоит отметить, что локальное скопление крови объёмом 30–50 мл приводит к компрессии головного мозга. При своевременной диагностике и лечении летальность составляет 5–10%. Приблизительно у 20% пациентов эпидуральной гематоме сопутствует субдуральная [7]. Субдуральная гематома располагается между твёрдой мозговой оболочкой и поверхностью мозга и составляет 1–13% от всех черепно-мозговых травм. Объём субдуральных гематом может достигать 250–300 мл, но чаще всего составляет 80–150 мл. В 60% случаев гематомы имеют толщину 10–15 мм. В большинстве случаев при острой субдуральной гематоме необходимо экстренное оперативное вмешательство: абсолютным показанием к операции считают гематому толщиной более 10 мм. Летальность составляет 50–90% [7].

В настоящее время известно множество методов диагностики внутричерепных гематом: рентгенография, ангиография, компьютерная томография, магнитно-резонансная томография и эхоэнцефалография [8–13]. Эти методы сложно отнести к экспресс-методам, так как они требуют доставки пациента в клинику, хотя очень часто от правильной и быстрой постановки диагноза именно на месте получения травмы, например при дорожно-транспортном происшествии, зависит судьба пациента.

Существуют оптические методы диагностики внутричерепных гематом [14–16], основанные на способности тканей головы и головного мозга в норме и при гематоме по-разному ослаблять свет. Для зондирования используют свет ближнего инфракрасного диапазона (0.75–1.40 мкм).

В работе [14] обсуждаются ограничения, которые возникают при оптическом детектировании гематомы методом *near infrared spectroscopy* (NIRS). В качестве существенных ограничений этого метода приводятся малый динамический диапазон обнаружения, высокое поглощение света волосами, нестабильность оптического контакта, многослойность структуры головы и малую глубину обнаружения гематомы. Для решения этих проблем предложено использовать импульсный источник света, излучающий на длине волны 0.805 мкм, и специальный зонд (*elastic optical probe*). В работе приводятся результаты измерений на имитаторе (фантоме) и на животных.

Для экспресс-диагностики внутричерепных гематом разработан портативный прибор «In-

frascanner Model 2000» (InfraScan Inc., США) [15], в котором в качестве источника излучения используется лазер, работающий на длине волны 0.805 мкм, и приёмник этого излучения, контактирующий посредством оптического волновода с кожей головы и расположенный на расстоянии 30–40 мм от точки ввода излучения в ткани головы. Прибор сравнивает поглощение излучения на длине волны 0.805 мкм левого и правого полушарий мозга в четырёх различных зонах головы (лобная, височная, теменная и затылочная). Поглощение излучения больше в том полушарии мозга, где находится гематома. В ходе клинических испытаний было выяснено, что прибор может выявить наличие внутричерепной гематомы с вероятностью 91%, но не позволяет определить параметры самой гематомы (объём, площадь, глубина залегания, форма гематомы, её точная локализация и т. д.), которые имеют важное диагностическое значение для дальнейших реанимационно-реабилитационных мероприятий [16]. Кроме того, «Infrascanner Model 2000» непосредственно контактирует с тканями головы, что существенно ограничивает его использование, так как в ряде случаев непосредственный контакт с головой пациента может нанести ему дополнительную травму. Таким образом, несмотря на существенный прогресс, разработка новых неконтактных оптических методов экспресс-диагностики внутричерепных гематом остаётся весьма актуальной задачей.

В настоящей работе разработана оптическая модель тканей головы и головного мозга в норме и при внутричерепной гематоме, которая позволяет получить распределение интенсивности света на поверхности кожи головы на расстоянии, превышающем размер пятна зондирующего лазерного излучения. Это распределение формируется фотонами, прошедшими внутрь головы и вернувшимися назад после рассеяния и поглощения её тканями с и без гематомы. В модели рассмотрена сочетанная эпидуральная и субдуральная гематома, занимающая пространство между внутренней поверхностью костей черепа и поверхностью мозга, как наиболее часто встречающаяся [5, 7]. В результате компьютерного моделирования получены распределения интенсивности света с длинами волн 0.730, 0.805 и 0.980 мкм на поверхности кожи головы в норме и при гематоме. Выбор длин волн обусловлен особенностями поглощения света кровью, из которой состоит гематома. Длина волны 0.730 мкм эффективнее поглощается ненасыщенной (с повышенным



содержанием гемоглобина) кислородом кровью, длина волны 0.980 мкм – насыщенной (с повышенным содержанием оксигемоглобина) кислородом кровью, а длина волны 0.805 мкм соответствует изобестической точке крови. В результате расчётом будет определена длина волны, на которой присутствие гематомы наиболее существенно влияет на распределение. В работе также исследуется влияние толщины кожи головы (скальпа), кости черепа и толщины гематомы на величину разности мощности рассеянного назад лазерного излучения на поверхности кожи головы в норме и при гематоме.

### 1. Оптическая модель тканей головы и головного мозга

Создание оптической модели всегда требует определённой аккуратности при выборе геометрии и оптических свойств. Для построения оптической модели головы и головного мозга необходимо использовать наиболее значимые с точки зрения оптики ткани. В настоящее время известно несколько оптических моделей головы и головного мозга.

В работе [17] описаны две модели головы, состоящие из пяти слоёв: кожа, череп, ликвор, серое вещество и белое вещество. Первая модель выполнена в виде плоских блоков, а вторая повторяет рельеф головного мозга, черепа и кожи. Лазерный источник с длиной волны зондирующего излучения 0.9 мкм располагается непосредственно на верхнем слое (коже). Приёмник излучения располагается на коже на расстоянии 20, 25, 30 и 40 мм от источника. Авторы приходят к выводу, что модель в виде плоских блоков адекватно описывает распространение света в тканях головы.

В работе [18] описана модель головы, состоящая из четырёх слоёв: скальп, череп, серое вещество и белое вещество.

В работе [19] рассматривают несколько моделей головы. Первая из них состоит из трёх слоёв: скальп/череп (объединены в один слой толщиной 12 мм), серое вещество (4 мм), белое вещество. Вторая модель отличается наличием четвёртого слоя (ликвор) толщиной 2 мм, лежащего непосредственно под слоем скальп/череп. Две другие модели состоят из четырёх слоёв, но по-разному имитируют борозды головного мозга. Лазерный источник с длиной волны зондирующего излучения 0.8 мкм и приёмник располагаются непосредственно на верхнем слое (скальп/череп). Отмечается, что при расстояниях

источник-приёмник больших 15 мм слой спинно-мозговой жидкости в модели необходим, так как излучение проходит на большие расстояния именно через него. Сложная геометрия борозд и границы между серым и белым веществом практически не влияет на распространение света.

В работе [20] рассмотрена оптическая модель головы, состоящая из трёх слоёв (скальп/череп, серое вещество, белое вещество), изогнутых с радиусом 90 мм. Толщина первого слоя изменяется дискретно: 7, 9, 11, 13 и 15 мм. Авторы используют десять приёмников излучения, отстоящих от источника на расстояние до 50 мм. Используется длина волны зондирующего излучения 0.78 мкм.

В статье [21] описана модель головы с плоской геометрией слоёв. Источниками зондирующего излучения являются светодиоды с длинами волн 0.592, 0.660, 0.830 и 0.915 мкм. Диаметр зондирующего пучка был взят равным 3 мм, а сам пучок считался коллимированным. Авторы пришли к выводу, что использование зондирующего излучения с длиной волны 0.592 мкм нецелесообразно из-за сильного ослабления при распространении в биоткани, а для проведения измерений на длине волны 0.660 мкм требуется большая мощность излучения, что может быть небезопасно.

В работе [22] описана компьютерная процедура (code) для 3D расчёта распространения (миграции) фотонов в высокорассеивающих средах, в том числе в тканях головы. В работе отмечается, что совместное использование этой процедуры с другими методами визуализации (МРТ, рентгеновская томография и т. д.) позволяет существенно повысить разрешающую способность диффузной оптической томографии. При расчётах авторы полагали, что для скальпа и черепа  $\mu_s'(\text{приведённый}) = 1 \text{ мм}^{-1}$ ,  $\mu_a = 0.04 \text{ мм}^{-1}$ ; для ликвора  $\mu_s' = 0.01 \text{ мм}^{-1}$ ,  $\mu_a = 0.001 \text{ мм}^{-1}$ ; для серого/белого вещества головного мозга  $\mu_s' = 1.25 \text{ мм}^{-1}$ ,  $\mu_a = 0.025 \text{ мм}^{-1}$ . В работе также отмечается, что для выполнения расчёта только в височной области 3D модели головы авторам потребовалось порядка десяти часов.

В работе [23] описан алгоритм, ускоряющий вычисления при Монте-Карло моделировании миграции фотонов в 3D мутных средах. Показано, что при параллельных вычислениях можно увеличить скорость до 300 раз.

Работа [24] посвящена совместному *in vivo* использованию МРТ и NIRS. Показано, что для оптимального детектирования состояния тканей





головного мозга источник и приёмник должны быть разнесены на 3.0–3.5 см. В работе отмечается, что этот метод может быть использован для детектирования травм головного мозга.

В работе [25] отмечается, что учёт особенностей анатомии при оптическом детектировании и моделировании тканей головы NIRS методом крайне важен. Влияние продемонстрировано на примере фронтального синуса, состояние которого существенным образом влияет на пространственное распределение света в тканях головы вплоть до глубины 20–25 мм, на которой залегает серое вещество головного мозга.

В работе [26] описана четырёхслойная модель головы в норме и при гематоме. Моделирование выполнено на длинах волн 0.75, 0.85, 0.95 и 1.05 мкм. Показано, что регистрация сигнала по времени позволяет повысить контрастность. Однако описанный в этой работе метод (TD NIRS) требует использования пикосекундных лазерных импульсов, что существенно усложняет аппаратную часть при практической реализации.

кундных лазерных импульсов, что существенно усложняет аппаратную часть при практической реализации.

На основании материалов, представленных выше в настоящей работе, в программном пакете «TracePro Expert-7.0.1 Release» (Lambda Research Corp., США) была разработана оригинальная трёхмерная геометрическая и оптическая модель головы и головного мозга человека в норме (рис. 1, а) и при гематоме (рис. 1, б). Модель состоит из пяти плоских слоёв (ширина×длина: 150 мм×150 мм): скальп (толщина от 0.5 до 3.0 мм), череп (толщина от 1 до 10 мм), ликвор (толщина 2 мм), серое вещество (толщина 4 мм) и белое вещество (толщина 20 мм). Внутречерепная гематома малого и среднего объёма – 0.5, 5, 25 и 50 мл – представлена в виде цилиндра диаметром 80 мм и высотой 0.1, 1, 5 и 10 мм соответственно, имеющего оптические свойства цельной крови.

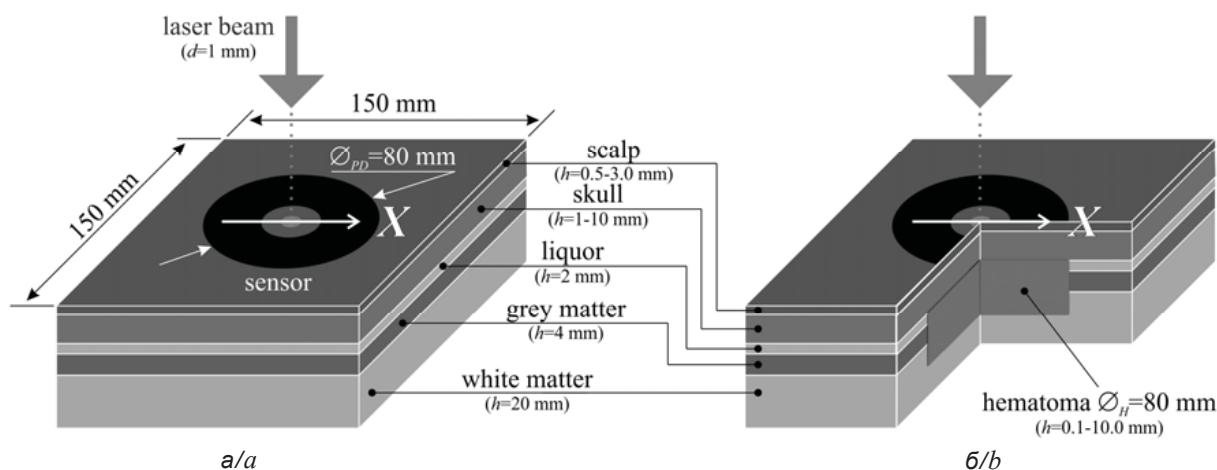


Рис. 1. Модель тканей головы и головного мозга в норме (а) и при гематоме (б) ( $h$  – толщина биоткани,  $d$  – диаметр лазерного пучка,  $\varnothing_{PD}$  – диаметр приёмника,  $\varnothing_H$  – диаметр гематомы,  $X$  – координатная ось)

Fig. 1. Model of the head (brain) tissues in norm (a) and in hematoma (b) ( $h$  – thickness of tissue,  $d$  – laser beam diameter,  $\varnothing_{PD}$  – sensor diameter,  $\varnothing_H$  – hematoma diameter,  $X$  – coordinate axis)

Значения коэффициентов поглощения и рассеяния тканей головы были выбраны из представленных в работах [17–19, 21, 27–31], значения коэффициента преломления – в работах [18, 32–35], фактора анизотропии – в работах [18, 21, 30, 36]. Оптические характеристики гематомы соответствуют оптическим характеристикам цельной крови, которые представлены в работах [37–39].

Оптические характеристики тканей головы и гематомы, используемые при моделировании в настоящей работе, приведены в таблице.

Источник лазерного излучения был расположен на расстоянии 1 м от первого слоя (скальпа), а его излучение представлено в виде коллимированного пучка диаметром 1 мм (см. рис. 1). Длины волн источника – 0.730, 0.805 и 0.980 мкм. Мощность излучения источника на всех длинах волн была одинаковой и составляла 10 мВт. Распределение энергии в пучке было равномерным. При моделировании использовано  $5 \cdot 10^9$  лучей. В качестве фазовой функции была использована функция Хеньи–Гринштейна. Пороговый вес фотона принимался равным  $10^{-8}$ .



**Оптические характеристики тканей головы и гематомы на длинах волн 0.730/0.805/0.980 мкм**  
**Optical properties of the head (brain) tissues and hematoma (wavelengths – 0.730/0.805/0.980 μm)**

Ткань Tissue	Оптические характеристики / Optical properties			
	$\mu_a$ , mm <sup>-1</sup>	$\mu_s$ , приведенный (reduced), mm <sup>-1</sup>	$g$	$n$
Скальп Skin (scalp)	0.035/0.03/0.03	3.2/2.3/1.5	0.72	1.44/1.43/1.42
Череп Bone (skull)	0.015/0.01/0.02	2.3/1.7/1.2	0.89/0.9/0.9	1.56
Ликвор Liquor	0.001	0.01	0.999	1.39
Серое вещество Grey matter	0.07/0.025/0.08	2.7/2.5/2.5	0.9	1.36
Белое вещество White matter	0.03/0.005/0.04	9.0/8.0/7.0	0.82	1.38
Гематома Hematoma	0.1/0.3/0.7	3.4/2.5/2.0	0.99	1.39

Приёмник диаметром 80 мм располагался на поверхности скальпа и поглощал весь падающий на него свет (см. рис. 1). Для беспрепятственного прохождения излучения от источника к скальпу в центре приёмника было сделано отверстие (диафрагма) диаметром 14 мм, в центр которого перпендикулярно поверхности скальпа падал пучок от источника лазерного излучения. В программном пакете «TracePro Expert-7.0.1 Release» была использована возможность отображения распределения интенсивности света на приёмной площадке приёмника, которое было тождественно распределению на поверхности кожи (скальпа) головы.

Полученные в результате компьютерного моделирования распределения интенсивности рассеянного назад лазерного излучения на поверхности кожи головы с и без гематомы для разных толщин кожи (скальпа), кости черепа были использованы для расчёта (в пределах площади, ограниченной размером приёмной площадки приёмника) мощности излучения на поверхности кожи головы в норме ( $W_1$ ) и мощности излучения на поверхности кожи головы при гематоме ( $W_2$ ), а также для вычисления их разности  $\Delta W$ .

**2. Моделирование распространения лазерного излучения в оптической модели тканей головы и головного мозга в норме и при внутричерепной гематоме**

На рис. 2, а – 4, а представлены распределения интенсивности рассеянного назад лазерного излучения на поверхности кожи (скальпа) головы в норме и при гематоме, полученные в результате расчётов с использованием описанной выше оптической модели для источников с длинами волн 0.730, 0.805 и 0.980 мкм соответственно.

Распределения представлены вдоль «координаты X», которая проходит через точку падения лазерного излучения на поверхность скальпа. На рис. 2, б – 4, б представлены зависимости разности мощности рассеянного назад лазерного излучения на поверхности головы в норме и при гематоме, характерные для перечисленных выше длин волн, от толщины кожи (скальпа) и кости черепа при толщине гематомы 10 мм. На этих графиках интенсивность  $I'$  (отн. ед.) и  $\Delta W'$  (отн. ед.) получены в результате деления текущих значений интенсивности и  $\Delta W$  соответственно на максимальное значение интенсивности для данной длины волны без гематомы и на значение  $\Delta W$  на длине волны 0.805 мкм для толщины скальпа 2 мм, толщины черепа 1 мм и толщины гематомы 10 мм (при этих геометрических параметрах  $\Delta W$  максимальна).

Следует отметить, что в результате распространения в тканях головы интенсивность света существенно падает. В нашем случае интенсивность регистрируемого на поверхности кожи головы рассеянного назад света в  $10^6$ – $10^8$  раз ниже интенсивности света, падающего на поверхность скальпа от источника, что коррелирует с данными, представленными в работе [26]. Очевидно, что при таком ослаблении из 10 мВт падающей мощности поверхности скальпа достигнет только 0.1–10.0 мкВт, что на практике, возможно, потребует использования фотоэлектронного умножителя или сверхчувствительных лавинных фотодиодов для регистрации, а также наносекундных лазеров в качестве источника света.

Из представленных зависимостей следует, что внутричерепная гематома вносит существенные искажения в форму распределения интенсивности света на поверхности скальпа.

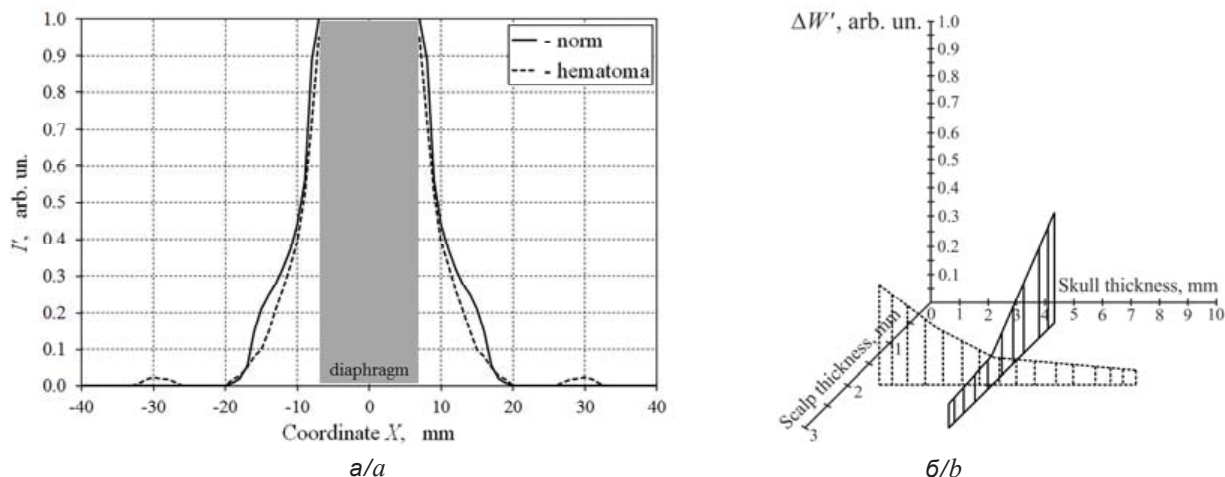


Рис. 2. Распределение интенсивности рассеянного назад лазерного излучения с длиной волны 0.730 мкм на поверхности кожи (скальпа) головы в норме и при гематоме (а) (толщина скальпа 2 мм, толщина черепа 5 мм, толщина гематомы 10 мм) и зависимость  $\Delta W'$  от толщины кожи (скальпа) и кости черепа (б) при толщине гематомы 10 мм

Fig. 2. Backscattered laser light intensity distribution with a wavelength of 0.730  $\mu\text{m}$  on the surface of the skin (scalp) in norm and in hematoma (a) (scalp thickness 2 mm, skull thickness 5 mm, hematoma thickness 10 mm) and the dependence of the  $\Delta W'$  from the thickness of the skin (scalp) and the bones of the skull (b) (hematoma thickness 10 mm)

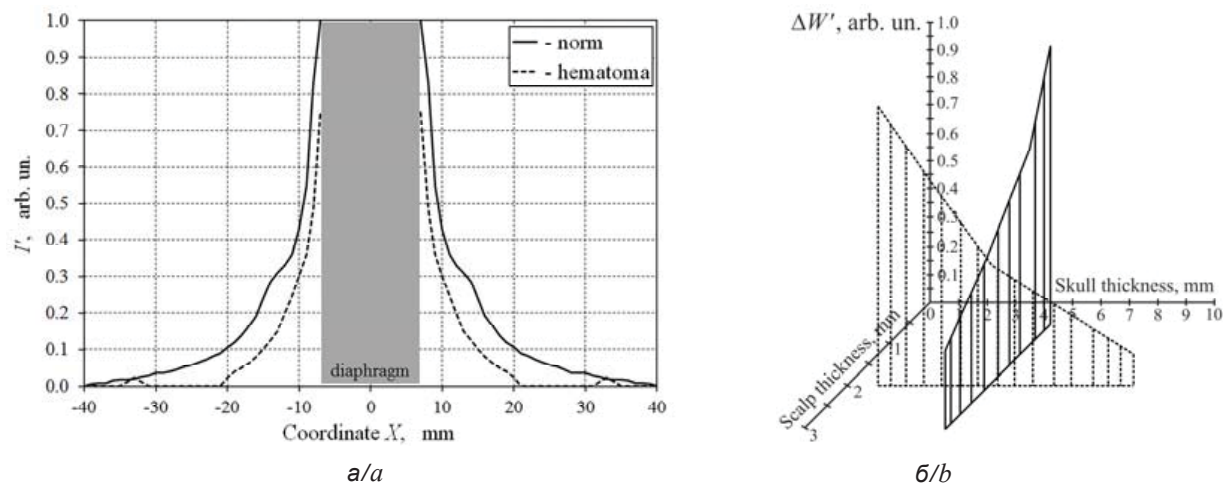


Рис. 3. Распределение интенсивности рассеянного назад лазерного излучения с длиной волны 0.805 мкм на поверхности кожи (скальпа) головы в норме и при гематоме (а) (толщина скальпа 2 мм, толщина черепа 5 мм, толщина гематомы 10 мм) и зависимость  $\Delta W'$  от толщины кожи (скальпа) и кости черепа (б) при толщине гематомы 10 мм

Fig. 3. Backscattered laser light intensity distribution with a wavelength of 0.805  $\mu\text{m}$  on the surface of the skin (scalp) in norm and in hematoma (a) (scalp thickness 2 mm, skull thickness 5 mm, hematoma thickness 10 mm) and the dependence of the  $\Delta W'$  from the thickness of the skin (scalp) and the bones of the skull (b) (hematoma thickness 10 mm)

В норме на длинах волн 0.730 мкм и 0.805 мкм распределение имеет форму круга («круговая» структура), часть которого не показана, так как не попадает на приёмник. На длине волн 0.980 мкм в норме и на всех длинах волн при гематоме распределение в центре имеет форму круга, а по краям – форму кольца (максимумы на некотором расстоянии от точки воздействия) – «кольцевая» структура. Эта «кольцевая» структура может

быть сформирована за счёт отражения ( $\Delta n = 0.17$ ) и поглощения света в гематоме. Можно предположить, что гематома выступает как своего рода поглощающий пространственный фильтр, т. е. поглощённые гематомой фотоны не достигают поверхности именно в этой её области, которая соответствует минимуму интенсивности в распределении. В этой связи чем толще гематома, тем сильнее эффект фильтрации и тем контрастнее

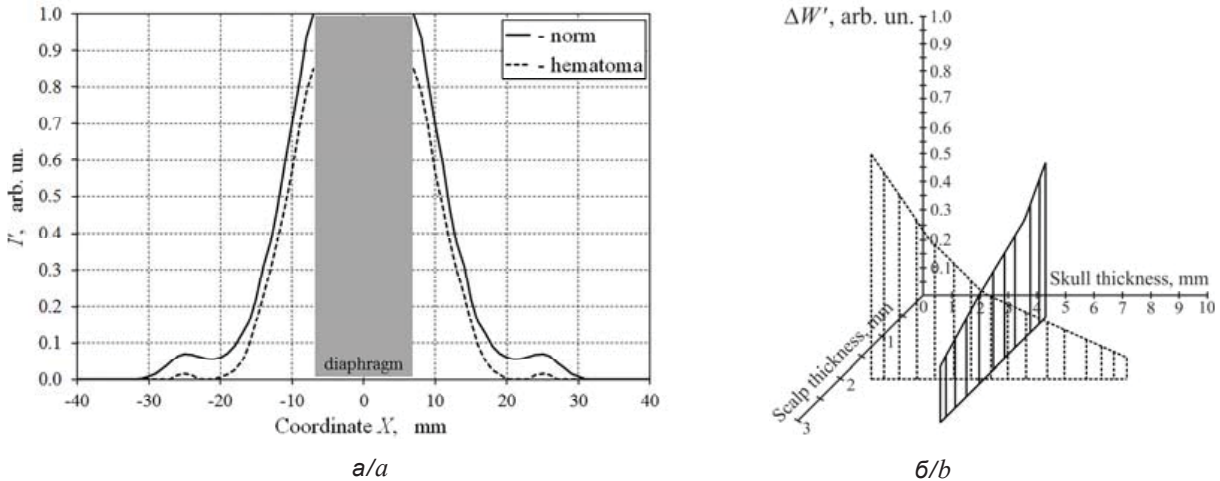


Рис. 4. Распределение интенсивности рассеянного назад лазерного излучения с длиной волны 0.980 мкм на поверхности кожи (скальпа) головы в норме и при гематоме (а) (толщина скальпа 2 мм, толщина черепа 5 мм, толщина гематомы 10 мм) и зависимость  $\Delta W'$  от толщины кожи (скальпа) и кости черепа (б) при толщине гематомы 10 мм

Fig. 4. Backscattered laser light intensity distribution with a wavelength of 0.980  $\mu\text{m}$  on the surface of the skin (scalp) in norm and in hematoma (a) (scalp thickness 2 mm, skull thickness 5 mm, hematoma thickness 10 mm) and the dependence of the  $\Delta W'$  from the thickness of the skin (scalp) and the bones of the skull (b) (hematoma thickness 10 mm)

«кольцевая» структура. Максимумы этих колец смещаются от центра распределения (точки воздействия лазерного излучения) в зависимости от длины волны. На длине волны 0.730 мкм максимумы расположены на расстоянии 30 мм, на длине волны 0.805 мкм – на расстоянии 33 мм, на длине волны 0.980 мкм – на расстоянии 25 мм. Максимальное отличие в интенсивностях этих «кольцевых» максимумов в норме и при гематоме наблюдается на длине волны 0.730 мкм. На основании представленных результатов можно заключить, что анализ распределения на длинах волн 0.730 мкм и 0.805 мкм может быть весьма перспективным для экспресс-диагностики гематомы, так как появление в распределении «колец» само по себе может служить сигналом о наличии гематомы.

Наибольшие отличия в «круговых» структурах с и без гематомы наблюдаются на длине волны 0.805 мкм, для которой интенсивности этих сигналов вблизи диафрагмы различают на 25%, в то время как на длине волны 0.980 мкм эта разница составляет 15%, а на длине волны 0.730 мкм – 5%.

Похожую на представленную в настоящей работе «кольцевую» структуру в распределении интенсивности рассеянного назад излучения на поверхности скальпа получили авторы [26]. В этой работе показано, что при гематоме в распределении интенсивности рассеянного назад сигнала появляется пространственная модуляция,

а глубина этой модуляции возрастает по мере увеличения объема гематомы. Максимальный объем гематомы в работе [26] составил 7.7 мл, что практически на порядок меньше объема гематомы (50 мл), результаты моделирования которой представлены на рис. 2–4 в настоящей работе. Следует отметить, что так же, как и авторы [26], мы наблюдали связь амплитуды модуляции с объемом гематомы, а именно чем больше был этот объем, тем выше была глубина модуляции, которая при 50 мл выродилась в «кольцевую» структуру. Вместе с тем дополнительные расчеты показали, что на «кольцевую» структуру, кроме объема, существенное влияние оказывает также форма гематомы. Если представить гематому в виде шара, то «кольцевая» структура исчезает. При попытке смещения места падения лазерного пучка относительно центра симметрии гематомы, представленной цилиндром, распределение на поверхности кожи головы становится несимметричным, и «кольцевая» структура сначала становится несимметричной, а в конечном итоге исчезает по мере удаления от границы гематомы. Следует обратить внимание на тот факт, что на рис. 2–4 «кольцевая» структура смещена от центра распределения к границе гематомы. Подобное поведение позволяет предположить, что эффект «кольцевой» структуры связан с вкладом границы гематомы, а именно образующей цилиндра. Этот вклад тем больше, чем толще гематома, а значит, тем больше её объем при постоянном диаметре.





Анализ мощности рассеянного назад сигнала показывает, что она различается в норме и при гематоме. Наибольшее различие наблюдается на длине волны 0.805 мкм. Так, например, при толщине скальпа 2 мм и толщине черепа 5 мм мощность рассеянного назад сигнала на длине волны 0.805 мкм при гематоме толщиной 10 мм составляет 50% от мощности сигнала в норме. На длине волны 0.980 мкм в этом случае разница составляет 40%, а на длине волны 0.730 мкм – 10%.

Также следует обратить внимание на существенное влияние, которое оказывают толщины тканей головы на мощность рассеянного назад света. С ростом толщины скальпа и черепа мощность рассеянного назад сигнала уменьшается как в норме, так и при гематоме. На всех рассмотренных длинах волн при этом изменение толщины скальпа оказывает более заметное влияние, чем изменение толщины черепа. Уменьшение мощности рассеянного назад сигнала в норме может быть связано с увеличением по мере увеличения толщины скальпа и черепа оптического хода лучей в них. Уменьшение при гематоме можно связать с тем, что при изменении толщины расположенных над ней тканей скальпа и черепа изменяется пространственное распределение падающих на гематому лучей, т. е. появляются

лучи, падающие на гематому под такими углами, под которыми они более эффективно, чем при меньших толщинах кожи и черепа, поглощаются в гематоме. Скорость уменьшения мощности рассеянного назад сигнала с ростом толщины кожи и черепа различается для тканей головы без и с гематомой. Однако, в конечном итоге, на всех рассмотренных длинах волн увеличение толщины скальпа и черепа приводит к уменьшению  $\Delta W'$ . Данный эффект может быть использован при диагностике глубины залегания гематомы, так как очевидно, что чем меньше  $\Delta W'$ , тем глубже расположена гематома.

Полученный в результате расчётов массив данных о поведении интенсивности рассеянного назад лазерного излучения на поверхности кожи головы в норме и при гематоме позволил построить зависимость относительной разности мощности рассеянного назад лазерного излучения на поверхности кожи головы в норме и при гематоме ( $\Delta W''$ ) от толщины гематомы. Данная зависимость при толщине скальпа 2 мм и толщине черепа 5 мм представлена на рис. 5. Величина  $\Delta W''$  получена при делении текущего значения  $\Delta W'$  на максимальное значение  $\Delta W'$  для представленных выше толщин тканей головы на длине волны 0.805 мкм.

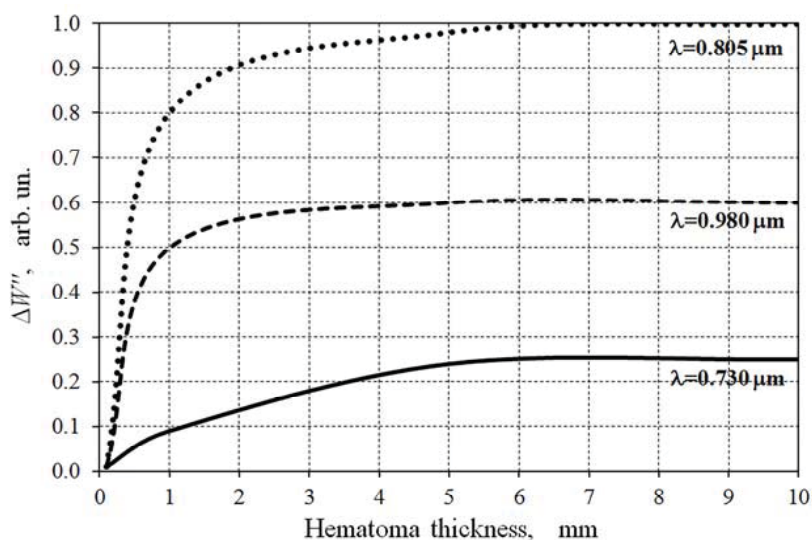


Рис. 5. Зависимость относительной разности  $\Delta W''$  рассеянного назад лазерного излучения на поверхности кожи головы в норме и при гематоме от толщины гематомы (толщина скальпа 2 мм, толщина черепа 5 мм)

Fig. 5. The dependence of the  $\Delta W''$  from hematoma thickness (scalp thickness 2 mm, skull thickness 5 mm)

Видно, что наибольшая разность  $\Delta W''$  наблюдается на длине волны 0.805 мкм, а наименьшая – на длине волны 0.730 мкм. Очевидно, это

связано с более низким, чем на других длинах волн, поглощением черепом излучения на длине волны 0.805 мкм ( $\mu_a=0.01 \text{ мм}^{-1}$ ) и кровью излу-



чения на длине волны 0.730 мкм ( $\mu_a=0.1 \text{ мм}^{-1}$ ). Следует также обратить внимание на нелинейный характер представленной зависимости. На первоначальном участке, до тех пор, пока толщина гематомы не превысила  $6\pm 1$  мм, разность  $\Delta W''$  увеличивается с ростом толщины гематомы. При дальнейшем возрастании толщины гематомы разность  $\Delta W''$  перестаёт изменяться. На длинах волн 0.805 мкм и 0.980 мкм разность  $\Delta W''$  достигает 90% от максимального значения при толщине гематомы равной 2 мм, а на длине волны 0.730 мкм – при толщине 4 мм. Этот факт можно объяснить более высоким, чем на других длинах волн, рассеянием кровью излучения на длине волны 0.730 мкм ( $\mu_s'=3.4 \text{ мм}^{-1}$ ).

Представленные в настоящей работе результаты весьма близки к результатам работы [26], авторы которой использовали четырёхслойную модель и не разделяли серого и белого вещества головного мозга. Использование пятислойной модели, очевидно, позволяет точнее описать распространение света в тканях головного мозга, но, так как гематома практически полностью блокирует доступ света к тканям коры головного мозга, учёт особенностей её строения в рамках послойного моделирования представляется не столь необходимым, как учёт толщины скальпа, черепа и самой гематомы. Таким образом, отмеченная выше близость результатов моделирования (корреляция формы и амплитуды пространственного распределения рассеянного назад сигнала на поверхности кожи в норме и при гематоме) очевидно показывает преемственность и позволяет надеяться на адекватность предложенной авторами настоящей работы пятислойной модели. Вместе с тем нет полного совпадения, так как в [26] моделирование выполнено на близких, но всё-таки отличных от использованных в настоящей работе длинах волн излучения.

К преимуществам анализа сигнала на длине волны 0.805 мкм по сравнению с другими, в том числе использованными в работе [26] длинами волн, кроме высокой чувствительности к присутствию гематомы можно отнести её изобестичность, которая исключает влияние на результаты измерений присутствия кислорода в крови. В работе [14] также в качестве источника света рекомендован светодиод, излучающий на длине волны 0.805 мкм (мощность 3.5 мВт), что исключает влияние на результаты детектирования гематомы насыщенности крови кислородом. Это обстоятельство весьма важно, так как при гематоме содержание кислорода в ней может

существенно изменяться в течение времени. Использование лазерного, а не светодиодного излучения позволит повысить яркость, что в совокупности с возможностью генерации наносекундных импульсов может существенно упростить систему детектирования и повысить соотношение сигнал/шум в приёмном тракте.

### Заключение

Разработана оптическая модель тканей головы и головного мозга в норме и при наличии гематомы. Модель состоит из пяти плоских слоёв. Сочетанная эпидуральная и субдуральная гематома малых и средних размеров смоделирована в виде цилиндра, полностью состоящего из крови. В результате компьютерного моделирования с использованием данной модели определено влияние толщины кожи головы (скальпа) и кости черепа на разность мощностей рассеянного назад лазерного излучения на поверхности кожи головы в норме и при наличии гематомы, а именно показано, что разность этих мощностей в норме и при наличии гематомы тем больше, чем меньше толщина кожи головы (скальпа) и кости черепа. Наибольшая для рассмотренных в работе длин волн разность мощности рассеянного назад лазерного излучения на поверхности кожи головы в норме и при наличии гематомы наблюдалась на длине волны зондирующего лазерного излучения 0.805 мкм. Установлено, что при увеличении толщины гематомы разность мощности рассеянного назад лазерного излучения на поверхности кожи головы в норме и при наличии гематомы нелинейно увеличивается вплоть до достижения гематомой толщины  $6\pm 1$  мм, а затем не изменяется. Показано, что в норме на длинах волн 0.730 мкм и 0.805 мкм распределение интенсивности рассеянного назад лазерного излучения на поверхности кожи головы имеет форму круга, на длине волны 0.980 мкм в норме и на всех длинах волн при гематоме распределение в центре имеет форму круга, а по краям – форму кольца.

Полученные результаты могут быть положены в основу нового неконтактного оптического метода экспресс-диагностики внутричерепной гематомы, заключающегося в фото- или видеорегистрациях распределения интенсивностей рассеянного назад лазерного излучения на поверхности кожи головы.

### Благодарности

Авторы благодарят Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оп-



тики (Университет ИТМО; Россия), компании «Medineqs Ltd.» (Кипр) и ООО «Нела» (Россия) за финансовую поддержку.

Авторы благодарят С. Н. Смирнова (Университет ИТМО) за помощь в редактировании рукописи.

### Список литературы

1. Шилкин В. В. Анатомия по Пирогову. Атлас анатомии человека. М. : Медицина, 2013. 724 с.
2. Сапин М. Р. Анатомия человека. М. : Медицина, 1993. 560 с.
3. Бурых М. П., Григорьева И. А. Клиническая анатомия мозгового отдела головы. Харьков : Каравелла, 2002. 240 с.
4. Большой медицинский словарь. URL: <http://www.medsiv.ru> (дата обращения: 17.02.2017).
5. Смычек В. Б., Пономарёва Е. Н. Черепно-мозговая травма. Минск : НИИ МЭ и Р, 2010. 430 с.
6. Кондаков Е. Н., Кривецкий В. В. Черепно-мозговая травма : руководство для врачей неспециализированных стационаров. СПб. : СпецЛит, 2002. 272 с.
7. Котельников Г. П., Миронов С. П. Травматология : национальное руководство. М. : ГЭОТАР-Медиа, 2008. 820 с.
8. Кишковский А. Н., Тютин Л. А. Неотложная рентгенодиагностика. М. : Медицина, 1989. 238 с.
9. Марусина М. Я., Казначеева А. О. Современные виды томографии. СПб. : ИТМО, 2006. 131 с.
10. Верещагин Н. В., Брагина Л. К. Компьютерная томография головного мозга. М. : Медицина, 2002. 251 с.
11. Хорнак Д. П. Основы МРТ. URL: <http://www.cis.rit.edu/htbooks/mri/inside-r.htm> (дата обращения: 17.02.2017).
12. Труфанов Г. Е., Рамшивили Т. Е. Лучевая диагностика. Травмы головы и позвоночника. СПб. : ЭЛБИ-СПб, 2006. 195 с.
13. Дмитриева Т. Б., Краснов В. Н. Психиатрия. Национальное руководство. М. : ГЭОТАР-Медиа, 2009. 993 с.
14. Zhang Q., Ma H., Nioka S., Chance B. Study of near infrared technology for intracranial hematoma detection // J. Biomed. Opt. 2000. Vol. 5, iss. 2. P. 206–213. DOI: 10.1117/1.429988.
15. InfraScanner model 2000. URL: [http://www.sintogroup.ru/infrascanner\\_2000/index.htm](http://www.sintogroup.ru/infrascanner_2000/index.htm) (дата обращения: 17.02.2017).
16. Кутергина Е. С., Аристов А. А. Ближняя инфракрасная спектроскопия для определения внутричерепных гематом // Современные техника и технологии : XIX междунар. науч.-практ. конф. Томск : Национальный исследовательский Томский политехнический университет, 2013. С. 397–398.
17. Korhonen V. O., Myllyla T. S., Kirillin M. Y., Popov A. P., Vykov A. V., Gorshkov A. V., Sergeeva E. A., Kinnunen M., Kiviniemi V. Light propagation in NIR spectroscopy of the human brain // IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics. 2014. Vol. 20, iss. 2. P. 289–298. DOI: 10.1109/JSTQE.2013.2279313.
18. Herrera-Vega J., Orihuela-Espina F. Image Reconstruction in Functional Optical Neuroimaging the modelling and separation of the scalp blood flow : A research proposal. Division of Computational Sciences. National Institute of Astrophysics, Optics and Electronics, INAOE (Mexico) CCC-15-002, 2015. 47 p.
19. Okada E., Firbank M., Schweiger M., Arridge S. R., Cope M., Delpy D. T. Theoretical and experimental investigation of near-infrared light propagation in a model of the adult head // Applied Optics. 1997. Vol. 36, iss. 1. P. 21–31. DOI: 10.1364/AO.36.000021.
20. Leung T. S., Elwell C. E. Estimation of cerebral oxygen and deoxy-haemoglobin concentration changes in a layered adult head model using near-infrared spectroscopy and multivariate statistical analysis // Physics in Medicine and Biology. 2005. Vol. 50. P. 5783–5798. DOI:10.1088/0031-9155/50/24/002.
21. Сорвойя Х. С. С., Мюллюля Т. С., Кириллин М. Ю., Сергеева Е. А., Мюллюля Р. А., Элесуд А. А., Никкинен Ю., Тервонен О., Кивиниеми В. Неинвазивный МРТ-совместимый волоконно-оптический прибор для функциональной рефлектометрии мозга человека в оптическом и ближнем ИК диапазонах // Квантовая электроника. 2010. Т. 40, № 12. С. 1067–1073. DOI: 10.1070/QE2010v040n12ABEH014503.
22. Boas D. A., Culver J. P., Stott J. J., Dunn A. K. Three dimensional Monte Carlo code for photon migration through complex heterogeneous media including the adult human head // Opt. Express. 2002. Vol. 10, iss. 3. P. 159–170. DOI: 10.1364/OE.10.000159.
23. Fang Q. Q., Boas D. A. Monte Carlo Simulation of Photon Migration in 3D Turbid Media Accelerated by Graphics Processing Units // Opt. Express. 2009. Vol. 17, iss. 22. P. 20178–20190. DOI: 10.1364/OE.17.020178.
24. Chuang C. C., Chen C. M., Hsieh Y. S., Liu T. C., Sun C. W. Brain structure and spatial sensitivity profile assessing by near-infrared spectroscopy modeling based on 3D MRI data // J. Biophotonics. 2013. Vol. 6, iss. 3. P. 267–274. DOI: 10.1002/jbio.201200025.
25. Kurihara K., Kawaguchi H., Obata T., Ito H., Sakatani K., Okada E. The influence of frontal sinus in brain activation measurements by near-infrared spectroscopy analyzed by realistic head models // Biomed. Opt. Express. 2012. Vol. 3, iss. 9. P. 2121–2130. DOI: 10.1364/BOE.3.002121.
26. Francis R., Khan B., Alexandrakis G., Florence J., MacFarlane D. NIR light propagation in a digital head model for traumatic brain injury (TBI) // Biomed. Opt. Express. 2015. Vol. 6, iss. 9. P. 3256–3267. DOI: 10.1364/BOE.6.003256.
27. Van der Zee P., Essenpreis M., Delpy D. T. Optical properties of brain tissue // Proc. of SPIE. 1993. Vol. 1888. P. 454–465. DOI: 10.1117/12.154665.
28. Sandell J. L., Zhu T. C. A review of *in-vivo* optical properties of human tissues and its impact on PDT // J. Biophotonics. 2011. Vol. 4, iss. 11–12. P. 773–787. DOI: 10.1002/jbio.201100062.



29. *Bashkatov A. N., Genina E. A., Kochubey V. I., Tuchin V. V.* Optical properties of human cranial bone in the spectral range from 800 to 2000 nm // Proc. of SPIE. 2006. Vol. 6163. P. 616310-1–616310-11. DOI: 10.1117/12.697305.
30. *Van der Zee P.* Measurement and modelling of the optical properties of human tissue in the near infrared. L.: University College London, 1992. 302 p.
31. *Delpy D. T., Cope M.* Quantification in tissue near-infrared spectroscopy // Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. 1997. Vol. 352, iss. 1354. P. 649–659. DOI: 10.1098/rstb.1997.0046.
32. *Ding H., Lu J. Q., Wooden W. A., Kragel P. J., Hu X. H.* Refractive indices of human skin tissues at eight wavelengths and estimated dispersion relations between 300 and 1600 nm // Phys. Med. Biol. 2006. Vol. 51. P. 1479–1489. DOI:10.1088/0031-9155/51/6/008.
33. *Binding J., Arous J. B., Leger J.-F., Gigan S., Voccaro C., Bourdieu L.* Brain refractive index measured *in vivo* with high-NA defocus-corrected full-field OCT and consequences for two-photon microscopy // Opt. Express. 2011. Vol. 19, iss. 6. P. 4833–4847. DOI: 10.1364/OE.19.004833.
34. *Ascenzi A., Fabry C.* Technique for dissection and measurement of refractive index of osteones // J. of Biophysical and Biochemical Cytology. 1959. Vol. 6, iss. 1. P. 139–143.
35. *Kertzscher U., Schneider T., Goubergrits L., Affeld K., Hanggi D., Spuler A.* *In Vitro* Study of Cerebrospinal Fluid Dynamics in a Shaken Basal Cistern after Experimental Subarachnoid Hemorrhage // PLoS One. 2012. Vol. 7, iss. 8. e41677. DOI: 10.1371/journal.pone.0041677.
36. *Van der Zee P., Essenpreis M., Delpy D. T.* Optical properties of brain tissue // Proc. of SPIE. 1993. Vol. 1888. P. 454–465. DOI: 10.1117/12.154665.
37. *Faber D. J., Aalders M. C. G., Mik E. G., Hooper B. A., van Gemert M. J. C., van Leeuwen T. G.* Oxygen Saturation-Dependent Absorption and Scattering of Blood // Phys. Rev. Lett. 2004. Vol. 93, iss. 2. P. 028102-1–028102-4. DOI: 10.1103/PhysRevLett.93.028102.
38. *Jacques S. L.* Optical properties of biological tissues: a review // Phys. Med. Biol. 2013. Vol. 58, № 11. P. R37–R61. DOI: 10.1088/0031-9155/58/11/R37.
39. *Friebel M., Roggan A., Muller G., Meinke M.* Determination of optical properties of human blood in the spectral range 250 to 1100 nm using Monte Carlo simulations with hematocrit-dependent effective scattering phase functions // Journal of Biomedical Optics. 2006. Vol. 11, iss. 3. P. 034021-1–034021-10. DOI: 10.1117/1.2203659.

#### Образец для цитирования:

Беликов А. В., Скрипник А. В., Антропова М. М. Численное моделирование методом Монте–Карло распространения лазерного излучения в многослойной среде, имитирующей ткани головы в норме и при внутричерепной гематоме // Изв. Сарат. ун-та. Нов. сер. Сер. Физика. 2017. Т. 17, вып. 3. С. 158–170. DOI: 10.18500/1817-3020-2017-17-3-158-170.

#### Monte Carlo Simulation of Laser Radiation Propagation in the Multilayers Model of Head and Brain Tissues in Health and in the Presence of Intracranial Hematoma

A. V. Belikov, A. V. Skrypnik, M. M. Antropova

Andrey V. Belikov, ORCID 0000-0001-8733-4860, Saint Petersburg National Research University of Information Technologies, Mechanics and Optics, 49, Kronverkskiy Av., Saint Petersburg, 197101, Russia, avbelikov@gmail.com

Alexei V. Skrypnik, ORCID 0000-0001-6424-2007, Saint Petersburg National Research University of Information Technologies, Mechanics and Optics, 49, Kronverkskiy Av., Saint Petersburg, 197101, Russia, alesch\_skrypnik@mail.ru

Maria M. Antropova, ORCID 0000-0003-1374-7990, Saint Petersburg National Research University of Information Technologies, Mechanics and Optics, 49, Kronverkskiy Av., Saint Petersburg, 197101, Russia, antropovamm@mail.ru

**Background and Objectives:** Development of new optical methods of non-contact express diagnostics of intracranial hematoma remains an actual task. The development of optical model of the head in norm and in the presence of intracranial hematoma is the aim of the present study. Influence of the dimensions of the head tissues with and without hematoma on distribution of the backscattered laser radiation intensity

is discussed. **Materials and Methods:** The optical model of the head and brain tissues in norm and in the presence of intracranial hematoma is developed. The computer simulations (Monte Carlo method) of the laser radiation propagation (wavelengths of 0.730  $\mu\text{m}$ , 0.805  $\mu\text{m}$  and 0.980  $\mu\text{m}$ ) were performed with the help of the developed model. **Results:** In case of hematoma the “ring” structure of the backscattered laser radiation intensity distribution is observed on the surface of the scalp. The influence of the skin thickness of the head (scalp), skull thickness and hematoma thickness on the difference in the power for backscattered laser radiation on the surface of the scalp in health and in the presence of hematoma is discussed. It is shown that this difference is maximal at the wavelength of laser radiation equal to 0.805  $\mu\text{m}$ . The smaller thickness of the scalp and the bones of the skull the greater this difference. It is shown that this difference is maximal at the wavelength of laser radiation of 0.805  $\mu\text{m}$ . The smaller the thickness of the skin of the head (scalp) and the bones of the skull the greater this difference. **Conclusion:** It was established that difference in the power of backscattered laser radiation on the surface of the scalp in health and in the presence of hematoma increases nonlinearly while increasing of the hematoma thickness. **Key words:** optical model, absorption, scattering, laser radiation, hematoma, blood, skin, skull, grey matter, white matter.

#### Acknowledgments

*This work was supported by the Saint Petersburg National Research University of Information Technologies, Mechanics and Optics (ITMO Uni-*





versity, Saint Petersburg, Russia), Nela Ltd. (Saint Petersburg, Russia) and Medineqs Ltd. (Nicosia, Cyprus) for equipment and support of this study.

The authors are also grateful to Sergey N. Smirnov (ITMO University, Saint Petersburg, Russia) for editing of this paper.

## References

- Shilkin V. V. *Anatomiia po Pirogovu. Atlas anatomii cheloveka* [Anatomy by Pirogov. Atlas of human anatomy]. Moscow, Medicine, 2013. 724 p. (in Russian).
- Sapin M. R. *Anatomiia cheloveka* [Human Anatomy]. Moscow, Medicine, 1993. 560 p. (in Russian).
- Burykh M. P., Grigor'eva I. A. *Klinicheskaya anatomiia mozgovogo otdela golovy* [Clinical anatomy of the cerebral part of the head]. Kharkov, Karavella, 2002. 240 p. (in Russian).
- Bol'shoi meditsinskii slovar'* [Large medical dictionary]. Available at: <http://www.medslv.ru> (accessed 17 February 2017) (in Russian).
- Smychek V. B., Ponomareva E. N. *Cherepno mozgovaia travma* [Skull-brain injury]. Minsk, NII MJe i R, 2010. 430 p. (in Russian).
- Kondakov E. N., Krivetskii V. V. *Cherepno mozgovaia travma: rukovodstvo dlia vrachei nespetsializirovannykh statsionarov* [Skull-brain injury: guide for unspecialized hospitals physicians]. St. Petersburg, SpetsLit, 2002. 272 p. (in Russian).
- Kotel'nikov G. P., Mironov S. P. *Travmatologiya: natsional'noe rukovodstvo* [Traumatology: national guide]. Moscow, GEOTAR-Media, 2008. 820 p. (in Russian).
- Kishkovskii A. N., Tiutin L. A. *Neotlozhnaya rentgenodiagnostika* [Emergency radiology]. Moscow, Medicine, 1989. 238 p. (in Russian).
- Marusina M. Ia., Kaznacheeva A. O. *Sovremennyye vidy tomografii* [Modern types of tomography]. St. Petersburg, Saint Petersburg National Research University of Information Technologies, Mechanics and Optics, 2006. 131 p. (in Russian).
- Vereshchagin N. V., Bragina L. K. *Komp'yuternaya tomografiya golovnogo mozga* [Computer tomography of the brain]. Moscow, Medicine, 2002. 251 p. (in Russian).
- Khornak D. P. *Osnovy MRT* (Basis of MRI). Available at: <http://www.cis.rit.edu/htbooks/mri/inside-r.htm> (accessed 17 February 2017) (in Russian).
- Trufanov G. E., Ramishvili T. E. *Luchevaya diagnostika. Travmy golovy i pozvonochnika* [Radiology. Head and spinal injuries]. St. Petersburg, ELBI-SPb, 2006. 195 p. (in Russian).
- Dmitrieva T. B., Krasnov V. N. *Psikhiatriya: natsional'noe rukovodstvo* [Psychiatry: national guide]. Moscow, GEOTAR-Media, 2009. 993 p. (in Russian).
- Zhang Q., Ma H., Nioka S., Chance B. Study of near infrared technology for intracranial hematoma detection. *J. Biomed. Opt.*, 2000. vol. 5, iss. 2, pp. 206–213. DOI: 10.1117/1.429988.
- InfraScanner model* (2000). Available at: [http://www.sintogroup.ru/infrascanner\\_2000/index.htm](http://www.sintogroup.ru/infrascanner_2000/index.htm) (accessed 17 February 2017) (in Russian).
- Kutergina E. S., Aristov A. A. Near infrared spectroscopy for the determination of intracranial hematoma. In: *Modern technics and technologies: XIX international scientific-practical conference*. Tomsk, Tomsk National Research Polytech University, 2013, pp. 397–398 (in Russian).
- Korhonen V. O., Myllyla T. S., Kirillin M. Y., Popov A. P., Bykov A. V., Gorshkov A. V., Sergeeva E. A., Kinnunen M., Kiviniemi V. Light propagation in NIR spectroscopy of the human brain. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, 2014, vol. 20, iss. 2, pp. 289–298. DOI: 10.1109/JSTQE.2013.2279313.
- Herrera-Vega J., Orihuela-Espina F. *Image Reconstruction in Functional Optical Neuroimaging the Modelling and Separation of the Scalp Blood Flow: A research proposal*. Division of Computational Sciences. National Institute of Astrophysics, Optics and Electronics, INAOE (Mexico) CCC-15-002, 2015. 47 p.
- Okada E., Firbank M., Schweiger M., Arridge S. R., Cope M., Delpy D. T. Theoretical and experimental investigation of near-infrared light propagation in a model of the adult head. *Applied Optics*, 1997, vol. 36, iss. 1, pp. 21–31. DOI: 10.1364/AO.36.000021.
- Leung T. S., Elwell C. E. Estimation of cerebral oxygenated and deoxy-haemoglobin concentration changes in a layered adult head model using near-infrared spectroscopy and multivariate statistical analysis. *Physics in Medicine and Biology*, 2005, vol. 50, pp. 5783–5798. DOI:10.1088/0031-9155/50/24/002.
- Sorvoya H. S. S., Miullliulia T. S., Kirillin M. Iu., Sergeeva E. A., Miullliulia R. A., Elesud A. A., Nikkinen Iu., Tervonen O., Kiviniemi V. Non-invasive, MRI-compatible fiberoptic device for functional near-IR reflectometry of human brain. *Quantum Electronics*, 2010, vol. 40, no. 12, pp. 1067–1073. DOI: 10.1070/QE2010v040n12ABEH014503 (in Russian).
- Boas D. A., Culver J. P., Stott J. J., Dunn A. K. Three dimensional Monte Carlo code for photon migration through complex heterogeneous media including the adult human head. *Opt. Express*, 2002, vol. 10, iss. 3, pp. 159–170. DOI: 10.1364/OE.10.000159.
- Fang Q. Q., Boas D. A. Monte Carlo Simulation of Photon Migration in 3D Turbid Media Accelerated by Graphics Processing Units. *Opt. Express*, 2009, vol. 17, iss. 22, pp. 20178–20190. DOI: 10.1364/OE.17.020178.
- Chuang C. C., Chen C. M., Hsieh Y. S., Liu T. C., Sun C. W. Brain structure and spatial sensitivity profile assessing by near-infrared spectroscopy modeling based on 3D MRI data. *J. Biophotonics*, 2013, vol. 6, iss. 3, pp. 267–274. DOI: 10.1002/jbio.201200025.
- Kurihara K., Kawaguchi H., Obata T., Ito H., Sakatani K., Okada E. The influence of frontal sinus in brain activation measurements by near-infrared spectroscopy analyzed by realistic head models. *Biomed. Opt. Express*, 2012, vol. 3, iss. 9, pp. 2121–2130. DOI: 10.1364/BOE.3.002121.
- Francis R., Khan B., Alexandrakis G., Florence J., MacFarlane D. NIR light propagation in a digital head model



- for traumatic brain injury (TBI). *Biomed. Opt. Express*, 2015, vol. 6, iss. 9, pp. 3256–3267. DOI: 10.1364/BOE.6.003256.
27. Van der Zee P., Essenpreis M., Delpy D. T. Optical properties of brain tissue. *Proc. of SPIE*, 1993, vol. 1888, pp. 454–465. DOI: 10.1117/12.154665.
28. Sandell J. L., Zhu T. C. A review of *in-vivo* optical properties of human tissues and its impact on PDT. *J. Biophotonics*, 2011, vol. 4, no. 11–12, pp. 773–787. DOI: 10.1002/jbio.201100062.
29. Bashkatov A. N., Genina E. A., Kochubey V. I., Tuchin V. V. Optical properties of human cranial bone in the spectral range from 800 to 2000 nm. *Proc. of SPIE*, 2006, vol. 6163, pp. 616310-1–616310-11. DOI: 10.1117/12.697305.
30. Van der Zee P. *Measurement and modelling of the optical properties of human tissue in the near infrared*. London, University College London, 1992. 302 p.
31. Delpy D. T., Cope M. Quantification in tissue near-infrared spectroscopy. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.*, 1997, vol. 352, iss. 1354, pp. 649–659. DOI: 10.1098/rstb.1997.0046.
32. Ding H., Lu J. Q., Wooden W. A., Kragel P. J., Hu X. H. Refractive indices of human skin tissues at eight wavelengths and estimated dispersion relations between 300 and 1600 nm. *Phys. Med. Biol.*, 2006, vol. 51, pp. 1479–1489. DOI: 10.1088/0031-9155/51/6/008.
33. Binding J., Arous J. B., Leger J.-F., Gigan S., Boccara C., Bourdieu L. Brain refractive index measured *in vivo* with high-NA defocus-corrected full-field OCT and consequences for two-photon microscopy. *Opt. Express*, 2011, vol. 19, iss. 6, pp. 4833–4847. DOI: 10.1364/OE.19.004833.
34. Ascenzi A., Fabry C. Technique for dissection and measurement of refractive index of osteones. *Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, 1959, vol. 6, iss. 1, pp. 139–143.
35. Kertzscher U., Schneider T., Goubergrits L., Affeld K., Hanggi D., Spuler A. *In vitro* Study of Cerebrospinal Fluid Dynamics in a Shaken Basal Cistern after Experimental Subarachnoid Hemorrhage. *PLoS ONE*, 2012, vol. 7, iss. 8, e41677. DOI: 10.1371/journal.pone.0041677.
36. Van der Zee P., Essenpreis M., Delpy D. T. Optical properties of brain tissue. *Proc. of SPIE*, 1993, vol. 1888, pp. 454–465. DOI: 10.1117/12.154665.
37. Faber D. J., Aalders M. C. G., Mik E. G., Hooper B. A., van Gemert M. J. C., van Leeuwen T. G. Oxygen Saturation-Dependent Absorption and Scattering of Blood. *Phys. Rev. Lett.*, 2004, vol. 93, iss. 2, pp. 028102-1–028102-4. DOI: 10.1103/PhysRevLett.93.028102.
38. Jacques S. L. Optical properties of biological tissues: a review. *Phys. Med. Biol.*, 2013, vol. 58, no. 11, pp. R37–R61. DOI: 10.1088/0031-9155/58/11/R37.
39. Friebe M., Roggan A., Muller G., Meinke M. Determination of optical properties of human blood in the spectral range 250 to 1100 nm using Monte Carlo simulations with hematocrit-dependent effective scattering phase functions. *J. Biomed. Opt.*, 2006, vol. 11, iss. 3, pp. 034021-1–034021-10. DOI: 10.1117/1.2203659.

**Cite this article as:**

Belikov A. V., Skrypnik A. V., Antropova M. M. Monte Carlo Simulation of Laser Radiation Propagation in the Multilayers Model of Head and Brain Tissues in Health and in the Presence of Intracranial Hematoma. *Izv. Saratov Univ. (N.S.), Ser. Physics*, 2017, vol. 17, iss. 3, pp. 158–170 (in Russian). DOI: 10.18500/1817-3020-2017-17-3-158-170.



УДК 532.77.11; 537.635

## ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ И ДИНАМИКИ МОЛЕКУЛ В РАСТВОРАХ КОЛЛАГЕНА И КОЛЛАГЕНАЗЫ МЕТОДОМ ДИНАМИЧЕСКОГО РАССЕЯНИЯ СВЕТА



И. А. Сергеева, К. А. Хитрина, А. Р. Крот, А. В. Сукнева, Г. П. Петрова

Сергеева Ирина Александровна, кандидат физико-математических наук, доцент кафедры молекулярных процессов и экстремальных состояний вещества, Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, sergeeva@physics.msu.ru

Хитрина Ксения Александровна, аспирант кафедры молекулярных процессов и экстремальных состояний вещества, Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, ksensanna@gmail.com

Крот Алексей Романович, бакалавр кафедры молекулярных процессов и экстремальных состояний вещества, Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, ar.krot@physics.msu.ru

Сукнева Анна Валерьевна, магистр кафедры молекулярных процессов и экстремальных состояний вещества, Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, av.sukneva@physics.msu.ru

Петрова Галина Петровна, доктор физико-математических наук, профессор кафедры молекулярных процессов и экстремальных состояний вещества, Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, petrova@phys.msu.ru

Бактериальная коллагеназа *Clostridium histolyticum* используется в современной медицине для лечения различных заболеваний. Важным ее свойством является способность к биодegradации основного белка межклеточного матрикса – коллагена. Спектрально-оптические методы, такие как фотонно-корреляционная спектроскопия, позволяют исследовать растворы молекул коллагена и коллагеназы в условиях, максимально приближенных к физиологическим. Моделировать различные процессы, протекающие в организме человека, можно путем изменения различных параметров среды: температуры, pH раствора, тип растворителя и добавок активаторов/ингибиторов фермента. На основе зависимости коэффициента трансляционной диффузии от pH среды, полученной методом динамического рассеяния света, определена изоэлектрическая точка бактериальной коллагеназы СНС (*Clostridium histolyticum*) типа IA (pI 6.0). Показано, что добавление в водный раствор бактериальной коллагеназы СНС хлорида кальция приводит к увеличению подвижности молекул фермента. Изучены временные зависимости коэффициента трансляционной диффузии и гидродинамического радиуса в растворах на основе смеси коллагена и коллагеназы в Tris-HCl буфере без добавок и с добавлением активатора – хлорида кальция. Из полученных данных следует, что добавление ионов кальция к растворам приводит к увеличению скорости биодegradации коллагена почти в 2 раза.

**Ключевые слова:** коллаген I типа, бактериальная коллагеназа, хлорид кальция, активатор, биодegradация, динамическое рассеяние света.

DOI: 10.18500/1817-3020-2017-17-3-171-178

### Введение

Препараты на основе ферментов используются в разных областях современной медицины: в хирургии, гинекологии, отоларингологии, офтальмологии, а также в дерматологии и косметологии. Одним из таких ферментов является бактериальная коллагеназа, вырабатываемая некоторыми микроорганизмами, например, *Clostridium histolyticum* СНС (возбудитель газовой гангрены).

Бактериальная коллагеназа СНС используется в клинической практике: для удаления некротических тканей из ран на микроскопическом уровне, лечения заболеваний глаз в офтальмологии, ускорения рассасывания швов из кетгута и расщепления переродившейся рубцовой ткани сухожилий при болезни Дюпюитрена [1, 2].

Важным свойством коллагеназы является ее способность к биодegradации основного белка межклеточного матрикса – коллагена. Бактериальная коллагеназа может расщеплять почти все типы коллагенов и способна разрушать не только пептидную цепь белка, но и многочисленные связи внутри тройных спиралей молекулы [3].

Структурные изменения коллагеновых фибрилл под воздействием коллагеназы с течением времени хорошо исследованы с помощью микроскопии, а также определена скорость дegradации белка [4]. Полученные результаты наглядно демонстрируют процесс расщепления коллагеновых волокон и позволяют количественно оценить скорость изменения диаметра коллагеновых фибрилл, однако плохо согласуются с результатами, полученными в условиях, приближенных к физиологическим [4].

Поскольку расщепление коллагена под действием фермента коллагеназы в растворах происходит в среднем за 60 мин, метод фотонно-корреляционной спектроскопии позволяет отслеживать динамику данного процесса в режиме реального времени. Моделировать различные процессы, протекающие в организме человека, можно путем изменения параметров среды: температуры, pH раствора, типа растворителя и добавок активаторов/ингибиторов фермента.



В данной работе с помощью метода динамического рассеяния света исследовались растворы коллагена I типа и бактериальной коллагеназы СНС типа IA с добавлением активатора хлорида кальция. Метод фотонно-корреляционной спектроскопии позволяет определять автокорреляционную функцию флуктуаций интенсивности рассеянного света, а при дальнейшей обработке получить распределения размеров частиц  $R_h$  или распределения коэффициентов трансляционной диффузии  $D_t$ .

### 1. Метод фотонно-корреляционной спектроскопии

Молекулярные движения макромолекул белков под воздействием тепловой энергии определяют динамику флуктуаций интенсивности рассеянного света в исследуемых системах. Эти движения представляют собой комбинацию трансляционной и вращательной диффузий, характер которых зависит от эффективных размеров и формы рассеивающих макромолекул, а также от их межмолекулярного электростатического взаимодействия, обусловленного величиной и характером пространственного распределения зарядовых центров на поверхности молекулы [5, 6].

Метод фотонно-корреляционной спектроскопии, известный также как метод динамического рассеяния света, позволяет определять автокорреляционную функцию флуктуаций интенсивности рассеянного света. При дальнейшей обработке становится возможным получение распределения размеров частиц или распределения коэффициентов трансляционной диффузии.

Флуктуации интенсивности рассеянного света возникают из-за неоднородности диэлектрической проницаемости среды. В жидкости они напрямую связаны с флуктуациями локальной концентрации частиц, обусловленными броуновским движением макромолекул.

В простейшем случае раствора, содержащего не взаимодействующие сферические частицы одного размера, спектр мощности фототока представляет собой кривую Лоренца [6] с полушириной  $\Gamma$ , а корреляционная функция интенсивности – экспоненту с временем релаксации  $\tau_{\text{рел}} = 1/\Gamma$ :

$$g^{(2)}(t) = pe^{-2\Gamma t} + 1. \quad (1)$$

Коэффициент  $\Gamma$  связан с физическими параметрами среды и условиями эксперимента следующим образом:

$$\Gamma = q^2 D_t, \quad (2)$$

$$q = k_i - k_s = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right), \quad (3)$$

$$D_t = \frac{KT}{6\pi\eta R_h}, \quad (4)$$

где  $D_t$  – коэффициент трансляционной диффузии частиц,  $k_i$  – волновой вектор падающего излучения,  $k_s$  – волновой вектор рассеянного излучения,  $n$  – показатель преломления среды,  $\lambda$  – длина волны рассеянного излучения,  $\theta$  – угол рассеяния,  $T$  – абсолютная температура среды,  $K$  – постоянная Больцмана,  $\eta$  – вязкость раствора,  $R_h$  – гидродинамический радиус частицы.

В случае полидисперсных растворов, когда размеры частиц различаются, спектр фототока представляет собой непрерывное множество (интеграл) кривых Лоренца с разными полуширинами. Следовательно, для нахождения распределения частиц по размерам (коэффициентам диффузии) необходимо решать обратную спектральную задачу в виде интегрального уравнения с лоренцевым ядром.

$$g^{(2)}(t) = [g^{(1)}(t)]^2 + 1 + \zeta(t), \quad (5)$$

$$g^{(1)}(t) = \int_0^{\infty} P(\Gamma) e^{-\Gamma t} d\Gamma, \quad (6)$$

где  $g^{(1)}(t)$  – нормированная автокорреляционная функция сигнала, а  $g^{(2)}(t)$  – нормированная автокорреляционная функция интенсивности,  $\zeta(t)$  – ошибка, связанная со стохастической природой самого сигнала [6].

Если пренебречь влиянием постоянного экспериментального шума  $\zeta(t)$  уравнение (5), известное как соотношение Зигерта, позволит вычислить  $g^{(1)}(t)$  через  $g^{(2)}(t)$ , накапливаемую коррелятором во время эксперимента.

Интегральное уравнение (6) формирует основной принцип обработки данных в фотонно-корреляционной спектроскопии. В проводимых экспериментах обработка результатов производилась с помощью программного обеспечения DYNALS (Израиль, SoftScientific), в котором поиск приближенного решения уравнения (6) осуществляется с помощью метода регуляризации А. Н. Тихонова для интегральных уравнений.

## 2. Исследуемые вещества

### 2.1. Коллаген

Коллаген играет важную роль в эволюции сложных организмов, формируя прочный нерастворимый каркас [7]. Это основной структурный





белок межклеточного матрикса. Он составляет от 25 до 33% общего количества белка в организме, т.е. около 6% массы тела. Название «коллаген» объединяет семейство близкородственных фибриллярных белков, которые являются основным белковым элементом кожи, костей, сухожилий, хряща, кровеносных сосудов, зубов. В разных тканях преобладают разные типы коллагена, а это, в свою очередь, определяется той ролью, которую он играет в конкретном органе или ткани [8].

В настоящее время известно 19 типов коллагена, которые отличаются друг от друга по первичной структуре пептидных цепей, функциям и локализации в организме. Наиболее распространен коллаген I типа. Его структура представляет собой три левозакрученных альфа-полипептида, свернутые в тройную правозакрученную спираль, стабилизированную водородными связями (между цепочками и внутри цепочек) [9].

В данной работе использовался коллаген I типа из кожи телят производства компании Sigma-Aldrich (США). Молекулярная масса белка около 300 кДа, длина молекулы составляет 300 нм.

Как и любой белок, коллаген функционирует в организме определенное время. Его относят к медленно обменивающимся белкам ( $T_{1/2}$  составляет недели или месяцы). Разрушение коллагеновых волокон осуществляется активными формами кислорода или ферментативно (гидролитически) [8].

Нативный коллаген не гидролизуется обычными пептидгидролазами. Основной фермент его катаболизма – коллагеназа, которая расщепляет пептидные связи в определенных участках молекулы.

## 2.2. Коллагеназа

Известны два типа коллагеназы: тканевая и бактериальная. Тканевая коллагеназа присутствует у человека в различных органах и тканях. Она обладает высокой специфичностью, перерезает тройную спираль коллагена в определенном месте, примерно на 1/4 расстояния от С-конца, между остатками глицина и лейцина или изолейцина [8].

Образующиеся фрагменты коллагена растворимы в воде. При температуре тела они спонтанно денатурируют и становятся доступными для действия других протеолитических ферментов.

Бактериальные коллагеназы менее избирательны и расщепляют от 150 до 200 связей в каждой полипептидной цепи коллагена. Они

гидролизуют неполярные участки молекулы белка, разрывая связь X-Гли в последовательности -R-Про-X-Гли (X – нейтральная аминокислота) (рис. 1).

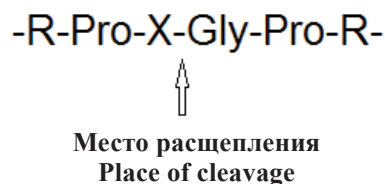


Рис. 1. Принцип действия бактериальной коллагеназы на коллаген

Fig. 1. The action of bacterial collagenase on collagen

Бактериальная коллагеназа не демонстрирует выраженного снижения ферментной активности и является наиболее подходящей для длительных экспериментов [10].

В настоящее время известно 7 форм коллагеназы, синтезируемой возбудителем газовой гангрены *Clostridium Hystolyticum*. Молярные массы коллагеназ СНС варьируются от 68 до 130 кДа. Изоэлектрическая точка находится в интервале pH 5.4–6.5 [11]. Активаторами коллагеназы являются ионы кальция и цинка [12, 13].  $Zn^{2+}$  отвечает за активацию амидной группы фермента, а  $Ca^{2+}$  – за формирование третичной структуры молекулы [14].

В данной работе использовалась бактериальная коллагеназа типа IA производства компании Sigma-Aldrich, синтезируемая возбудителем газовой гангрены *Clostridium histolyticum* (молекулярная масса 79 кДа).

## 3. Приготовление образцов

Для измерения pH-зависимостей использовался водный раствор коллагеназы с концентрацией 0.2 мг/мл. Необходимое значение pH раствора достигалось путем добавления кислоты HCl или щелочи KOH.

Для исследования растворов на основе смеси коллагена и коллагеназы использовался буфер Tris-HCl ( $10^{-2}$  М, pH 7.0). Концентрация коллагена в растворе составляла 0,1 мг/мл, концентрация коллагеназы – 0.2 мг/мл. Ионная сила раствора при добавлении хлорида кальция – 0.03 моль/л.

Все образцы перед измерениями обрабатывались в ультразвуковой ванне с частотой 30 кГц в течение 1 мин.

Эксперименты проводились на оптической установке «Photocor-Complex» с диодным лазе-



ром с длиной волны 647 нм и мощностью 25 мВт. Температура в кювете с исследуемым раствором поддерживалась на уровне 30°C при помощи встроенного в прибор термостата [15].

#### 4. Экспериментальные результаты

С помощью метода динамического рассеяния света были получены зависимости коэффициента трансляционной диффузии рассеивающих частиц  $D_t$  от pH в водных растворах коллагеназы (рис. 2).

Известно, что коэффициент трансляционной диффузии  $D_t$  линейно зависит от коэффициента межмолекулярного взаимодействия  $B$  [16]:

$$D_t = D_0\{1 + (2BM - [\eta])c\}. \quad (7)$$

Коэффициент взаимодействия меняется с ростом суммарного заряда на белке по параболическому закону (эффект Доннана) с минимумом в изоэлектрической точке [17]. Таким образом, из полученных данных следует, что изоэлектрическая точка для коллагеназы типа IA, синтезируемой *Clostridium histolyticum*, приходится на pH 6.0.

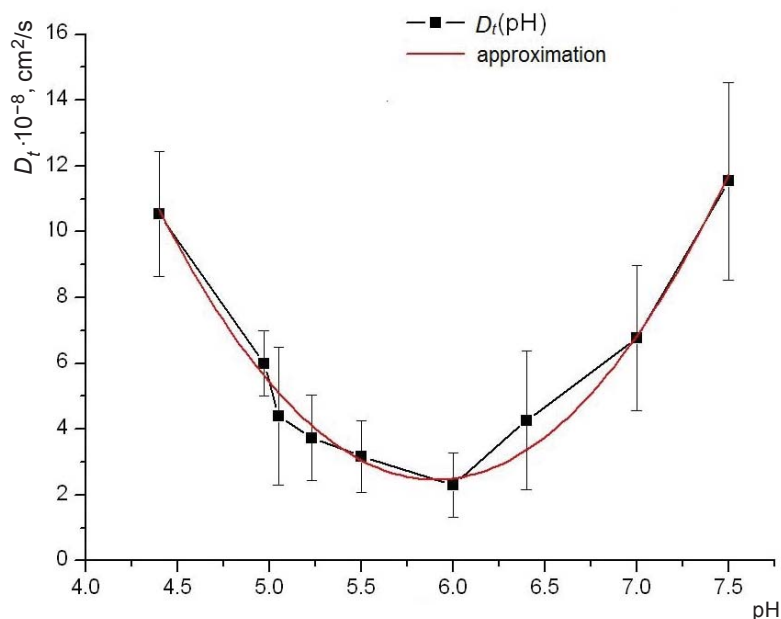


Рис. 2. Зависимость коэффициента трансляционной диффузии рассеивающих частиц  $D_t$  от pH в водных растворах коллагеназы (аппроксимирующая функция вида  $y=B_1 \cdot x+B_2 \cdot x^2$ )

Fig. 2. Dependence of translational diffusion coefficient of scattering particles  $D_t$  on pH in water solutions of collagenase (approximating function of the form  $y=B_1 \cdot x+B_2 \cdot x^2$ )

С помощью метода динамического рассеяния света были проведены эксперименты по измерению коэффициента трансляционной диффузии молекул коллагеназы в водных растворах при добавлении активатора  $\text{CaCl}_2$  (рис. 3).

Из рис. 3 видно, что с увеличением концентрации хлорида кальция в водном растворе коэффициент трансляционной диффузии рассеивающих частиц возрастает (подвижность молекул растёт).

Также были получены временные зависимости коэффициента трансляционной диффузии  $D_t$  рассеивающих частиц в растворах на основе смеси коллагена и коллагеназы в Tris-HCl буфере

без добавок (рис. 4, 1) и с добавлением активатора хлорида кальция (рис. 4, 2).

Значение коэффициента трансляционной диффузии в чистом Tris-HCl растворе коллагена и коллагеназы увеличилось за 60 мин с  $(1.5 \pm 0.2) \cdot 10^{-8}$  до  $(4.6 \pm 0.5) \cdot 10^{-8} \text{cm}^2/\text{s}$  и далее практически не менялось. При добавлении в раствор хлорида кальция значение  $D_t$  в течение первых 30 мин изменилось с  $(1.6 \pm 0.2) \cdot 10^{-8}$  до  $(14.0 \pm 2.1) \cdot 10^{-8} \text{cm}^2/\text{s}$ , после чего его рост замедлился.

С помощью программы DYNALS были рассчитаны зависимости гидродинамического радиуса  $R_h$  рассеивающих частиц от времени

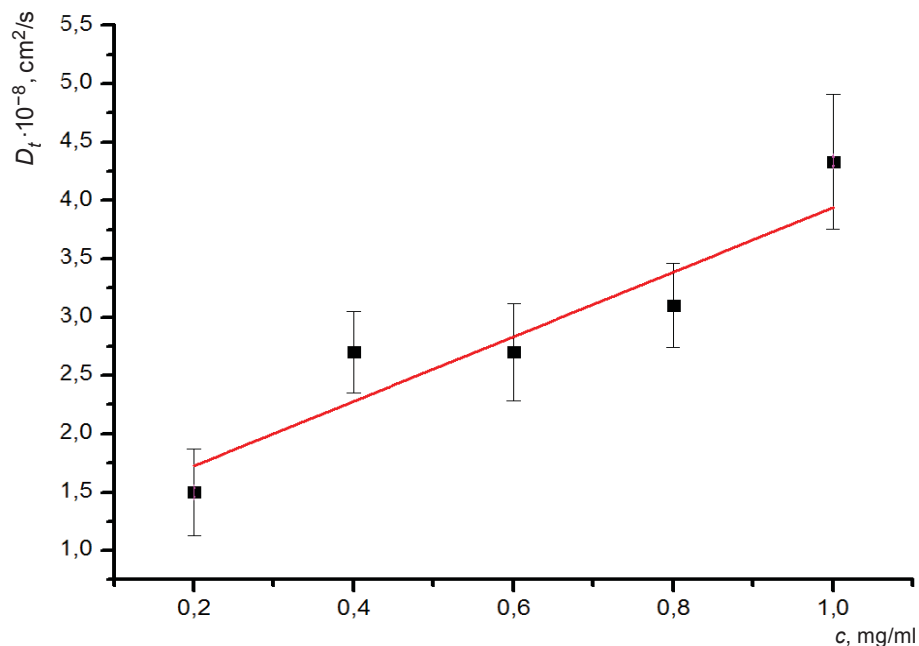


Рис. 3. График зависимости коэффициента трансляционной диффузии  $D_t$  от концентрации активатора  $\text{CaCl}_2$  в водных растворах коллагеназы

Fig. 3. Dependence of translational diffusion coefficient  $D_t$  on  $\text{CaCl}_2$  activator concentration in water solutions of collagenase

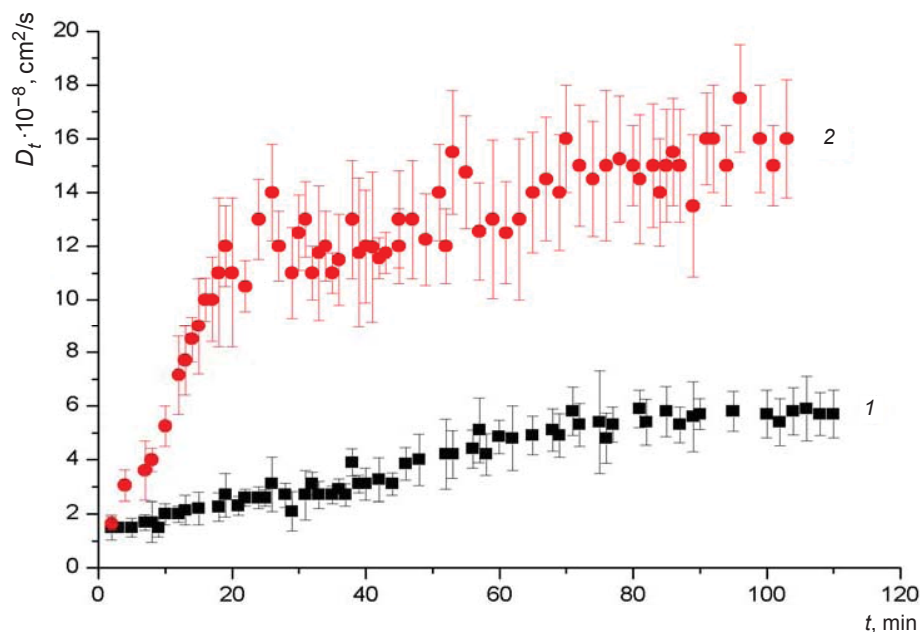


Рис. 4. Временная зависимость коэффициента трансляционной диффузии  $D_t$  для растворов на основе смеси коллагена и коллагеназы в Tris-HCl буфере без добавок (1) и с добавлением хлорида кальция (2)

Fig. 4. Translation diffusion coefficient ( $D_t$ ) on time dependencies of scattering particles in “collagen+collagenase” Tris-HCl buffer solutions (1) and with added  $\text{CaCl}_2$  (2)

для растворов смеси коллагена и коллагеназы в Tris-HCl без добавок (рис. 5, 1) и с добавлением хлорида кальция (рис. 5, 2).

Из рис. 5 видно, что размер рассеивающих частиц уменьшается со временем в обоих случаях. Значение гидродинамического радиуса

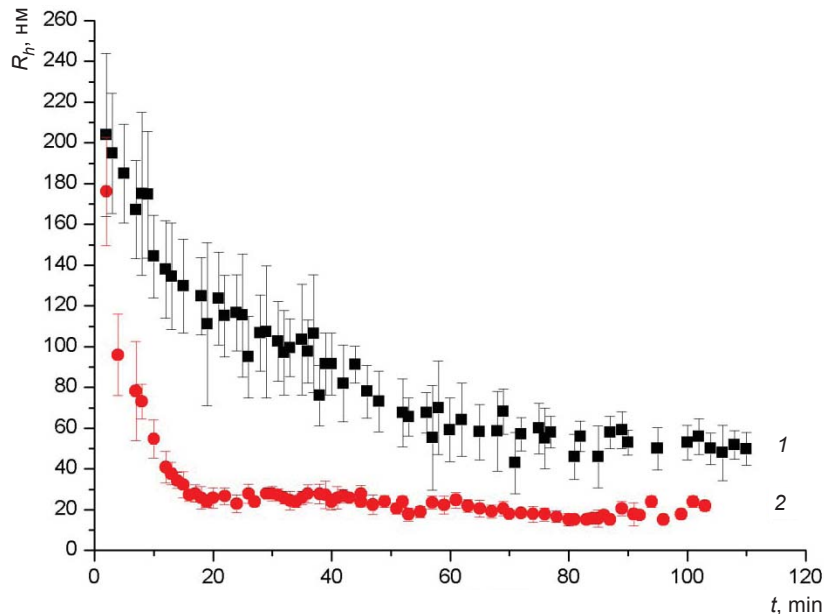


Рис. 5. Временная зависимость гидродинамического радиуса  $R_h$  для растворов на основе смеси коллагена и коллагеназы в Tris-HCl буфере без добавок (1) и с добавлением хлорида кальция (2)

Fig. 5. Hydrodynamic radius ( $R_h$ ) on time dependencies of scattering particles in "collagen+collagenase" Tris-HCl buffer solutions (1) and with added  $\text{CaCl}_2$  (2)

для растворов на основе смеси коллагена и коллагеназы в Tris-HCl буфере без добавок изменилось за 30 мин от  $200 \pm 25$  до  $110 \pm 15$  нм, а с добавлением активатора хлорида кальция – от  $180 \pm 20$  до  $27 \pm 3$  нм.

Наиболее интенсивное расщепление молекул коллагена происходит в течение первых 30 мин при добавлении в растворы ионов кальция (рис. 4, 2 и рис. 5, 2). В данном случае ионы  $\text{Ca}^{2+}$  включаются в активный центр фермента и обеспечивают конформацию, необходимую для связывания с пептидной цепью белка, что приводит к увеличению скорости расщепления коллагена [12].

#### Результаты и выводы

Полученные результаты дают возможность сделать вывод о том, что для бактериальной коллагеназы СНС типа IA зависимость коэффициента трансляционной диффузии от pH среды имеет нелинейный вид (близкий к параболическому) и достигает минимального значения в изоэлектрической точке (pH 6.0).

Активация бактериальной коллагеназы СНС в водном растворе хлоридом кальция приводит к увеличению подвижности молекул фермента.

Показана возможность применения метода динамического рассеяния света для определения

скорости биодеградации коллагена под воздействием коллагеназы в режиме реального времени в растворах. При добавлении хлорида кальция основное расщепление коллагеновых волокон происходит в течение первых 30 мин, в то время как в чистом растворе (без активатора) - в течение первых 60 мин (скорость увеличивается в 2 раза).

#### Список литературы

1. Hay D. C., Louie D. L., Earp B. E., Kaplan F. T., Akelman E., Blazar P. E. Surgical findings in the treatment of Dupuytren's disease after initial treatment with clostridial collagenase (Xiaflex) // *Hand Surg. Eur.* 2014. Vol. 39, № 5. P. 463–465.
2. Syed F., Thomas A. N., Singh S., Kolluru V., Emeigh Hart S. H., Bayat A. *In vitro* study of novel collagenase (Xiaflex) on Dupuytren's Disease fibroblasts displays unique drug related properties // *PLoS ONE.* 2012. Vol. 7, № 2. e31430. DOI: 10.1111/j.1524-475X.2012.00774.x
3. Ohbayashi N., Yamagata N., Goto M., Watanabe K., Yamagata Y., Murayama K. Enhancement of the structural stability of full-length Clostridial Collagenase by calcium ions // *Applied and Environmental Microbiology.* 2012. Vol. 78, № 16. P.5839-5844. DOI: 10.1128/AEM.00808-12.
4. Matthew F. P., Lin A. C., Goh M. C. Real-time enzymatic biodegradation of collagen fibrils monitored by atomic force microscopy // *International Biodeterioration & Biodegradation.* 2002. Vol. 50. P. 1–10.





5. Петрова Г. П., Петрусевич Ю. М. Сильные электростатические взаимодействия заряженных биополимеров в водных растворах // Биомедицинская радиоэлектроника. 2000. № 3. С. 41–47.
6. Камминс Г., Пайк Э. Спектроскопия оптического смешения и корреляция фотонов. М. : Книжный дом «Университет», 2002. 584 с.
7. Hulmes D. J. S. The collagen superfamily – diverse structures and assemblies // Essays in Biochemistry. 1992. Vol. 27. P. 49–67.
8. Северин Е. С. Биохимия : учебник для вузов. М. : Гэотар-Медиа, 2003. 779 с.
9. Kun Wu, Wentao Liu, Guoying Li. The aggregation behavior of native collagen in dilute solution studied by intrinsic fluorescence and external probing // Spectrochimica Acta. Part A : Molecular and Biomolecular Spectroscopy. 2013. Vol. 102. P. 186–193.
10. Radu F. A., Bause M., Knabner P., Friess W., Metz-macher I. Numerical simulation of drug release from collagen matrices by Enzymatic degradation // Computing and Visualization in Science. 2009. Vol. 12, № 8. P. 409–420. DOI: 10.1007/s00791-008-0118-9.
11. Mandl L., MacLennan J. D., Howes E. L., DeBellis R. H., Sohler A. Isolation and characterization of proteinase and collagenase from Clostridium histolyticum // J. Clin. Invest. 1953. Vol. 32. P. 1323–1329.
12. Wilson J. J., Matsushita O., Okabe A., Sakon J. A bacterial collagen-binding domain with novel calcium-binding motif controls domain orientation // The EMBO J. 2003. Vol. 22, № 8. P. 1743–1752. DOI 10.1093/emboj/cdg172.
13. Angleton E. L., Van Wart H. E. Preparation and Reconstitution with Divalent Metal Ions of Class I and Class II Clostridium histolyticum Apocollagenases // Biochemistry. 1988. Vol. 27. P. 7406–7412.
14. Eckhard U., Schönauer E., Nüss D., Brandstetter H. Structure of collagenase G reveals a chew-and-digest mechanism of bacterial collagenolysis // Nat. Struct. Mol. Biol. 2011. Vol. 18, № 10. P. 1109–1115. DOI: 10.1038/nsmb.2127
15. Компания Photocor Complex : сайт. URL: <http://www.photocor.ru> (дата обращения: 10.03.2017).
16. Масленникова А. Д., Сергеева И. А., Петрова Г. П. Влияние ионов тяжелых металлов на молекулярно-динамические характеристики молекул коллагена в водных растворах // Вестн. Моск. ун-та. Физика. Астрономия. 2013. № 2. С. 73–78.
17. Петрова Г. П. Оптические спектральные методы исследования жидкостей и растворов : в 2 ч. Ч. 1. М. : Физический факультет МГУ им. М. В. Ломоносова, 2008. 71 с.

#### Образец для цитирования:

Сергеева И. А., Хитрина К. А., Крот А. Р., Сукнева А. В., Петрова Г. П. Исследование взаимодействия и динамики молекул в растворах коллагена и коллагеназы методом динамического рассеяния света // Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Физика. 2017. Т. 17, вып. 3. С. 171–178. DOI: 10.18500/1817-3020-2017-17-3-171-178.

#### Investigation of the Interaction and Dynamics of Collagen and Collagenase Molecules in Solutions by Dynamic Light Scattering

I. A. Sergeeva, K. A. Khitrina,  
A. R. Krot, A. V. Sukneva, G. P. Petrova

Irina A. Sergeeva, ORCID 0000-0002-3492-133X, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory, Moscow, 119991, Russia, sergeeva@physics.msu.ru

Ksenia A. Khitrina, ORCID 0000-0003-0021-9822, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory, Moscow, 119991, Russia, ksensanna@gmail.com

Aleksey R. Krot, ORCID 0000-0001-6360-7203, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory, Moscow, 119991, Russia, ar.krot@physics.msu.ru

Anna V. Sukneva, ORCID 0000-0003-2846-5718, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory, Moscow, 119991, Russia, av.sukneva@physics.msu.ru

Galina P. Petrova, ORCID 0000-0002-1823-5081, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory, Moscow, 119991, Russia, petrova@phys.msu.ru

**Background and Objectives:** Bacterial collagenase from Clostridium histolyticum is widely used as a clinical tool in the nonsurgical treatment of Dupuytren's disease in eye's disorders treatment, for enzymatic debridement, for accelerated resorption of catgut sutures. Collagenase main feature is its ability to digest key protein of the animal extracellular matrix – collagen. Dynamic Light Scattering (DLS) technique allows for investigation of collagen and collagenase solutions in conditions close to physiological. Varying the solution parameters (pH, temperature, solvent type) and adding activators or inhibitors of collagenase one can simulate the processes in living organisms. **Materials and Methods:** DLS method enables one to assess the translation diffusion coefficient of particles in solutions by analyzing the characteristic time of scattered light intensity fluctuations. Experiments were carried out using the photon-correlation spectrometer Photocor-Complex with diode laser (wavelength 647 nm, power 25 mW). Collagen type I from calf skin and Bacterial collagenase from Clostridium histolyticum type IA produced by Sigma-Aldrich were used. **Results:** Using the DLS method we have experimentally obtained: dependence of the translation diffusion coefficient dependence on pH in collagenase water solutions (pI 6.0), translation diffusion coefficient on time dependencies of scattering particles in "collagen+collagenase" Tris-HCl buffer solution without additives and with addition of CaCl<sub>2</sub>. **Conclusion:** DLS enables us to monitor the dynamics of collagen biodegradation in real time. Different physiological states can be simulated for in-vitro investigation by varying temperature, solution formula and collagen-collagenase ratio.



**Key words:** collagen type I, bacterial collagenase, calcium chloride, activator, biodegradation, fluorescence spectroscopy, dynamic light scattering.

## References

1. Hay D. C., Louie D. L., Earp B. E., Kaplan F. T., Akelman E., Blazar P. E. Surgical findings in the treatment of Dupuytren's disease after initial treatment with clostridial collagenase (Xiaflex). *Hand Surg. Eur.*, 2014, vol. 39, no. 5, pp. 463–465.
2. Syed F., Thomas A. N., Singh S., Kolluru V., Emeigh Hart S. H., Bayat A. In vitro study of novel collagenase (Xiaflex) on Dupuytren's Disease fibroblasts displays unique drug related properties. *PLoS ONE*, 2012, vol. 7, no. 2, p. e31430. DOI: 10.1111/j.1524-475X.2012.00774.x
3. Ohbayashi N., Yamagata N., Goto M., Watanabe K., Yamagata Y., Murayama K. Enhancement of the structural stability of full-length Clostridial Collagenase by calcium ions. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, vol. 78, no. 16, pp. 5839–5844. DOI: 10.1128/AEM.00808-12.
4. Matthew F. P., Lin A. C., Goh M. C. Real-time enzymatic biodegradation of collagen fibrils monitored by atomic force microscopy. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2002, vol. 50, pp. 1–10.
5. Petrova G. P., Petrushevich Yu. M. Sil'nye elektrostatische vzaimodeistviia zariazhennykh biopolimerov v vodnykh rastvorakh. *Biomeditsinskaya radioelektronika*. [Biomedical electronics], 2000, no. 3, pp. 41–47 (in Russian).
6. Kammins G., Paik E. *Spektroskopiia opticheskogo smesheniia i korreliatsiia fotonov* [Spectroscopy of optical mixing and correlation of photons]. Moscow, Knizhnyi dom "Universitet", 2002. 584 p. (in Russian).
7. Hulmes D. J. S. The collagen superfamily – diverse structures and assemblies. *Essays in Biochemistry*, 1992, vol. 27, pp. 49–67.
8. Severin E. S. *Biokhimiia: Uchebnik dlia vuzov* [Biochemistry: Textbook for universities]. Moscow, Geotar-Media, 2003. 779 p. (in Russian).
9. Kun Wu, Wentao Liu, Guoying Li. The aggregation behavior of native collagen in dilute solution studied by intrinsic fluorescence and external probing. *Spectrochimica Acta. Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2013, vol. 102, pp. 186–193.
10. Radu F. A., Bause M., Knabner P., Friess W., Metzmacher I. Numerical simulation of drug release from collagen matrices by enzymatic degradation. *Computing and Visualization in Science*, 2009, vol. 12, no. 8, pp. 409–420. DOI: 10.1007/s00791-008-0118-9.
11. Mandl L., MacLennan J. D., Howes E. L., DeBellis R. H., Sohler A. Isolation and characterization of proteinase and collagenase from *Clostridium histolyticum*. *J. Clin. Invest.*, 1953, vol. 32, pp. 1323–1329.
12. Wilson J. J., Matsushita O., Okabe A., Sakon J. A bacterial collagen-binding domain with novel calcium-binding motif controls domain orientation. *The EMBO J.*, 2003, vol. 22, no. 8, pp. 1743–1752. DOI 10.1093/emboj/cdg172.
13. Angleton E. L., Van Wart H. E. Preparation and Reconstitution with Divalent Metal Ions of Class I and Class II *Clostridium histolyticum* Apocollagenases. *Biochemistry*, 1988, vol. 27, pp. 7406–7412.
14. Eckhard U., Schönauer E., Nüss D., Brandstetter H. Structure of collagenase G reveals a chew-and-digest mechanism of bacterial collagenolysis. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2011, vol. 18, no. 10, pp. 1109–1115. DOI: 10.1038/nsmb.2127
15. *The Photocor Company webpage*. Available at: <http://www.photocor.ru> (accessed 10 March 2017).
16. Maslennikova A. D., Sergeeva I. A., Petrova G. P. Effect of heavy-metal ions on dynamic characteristics of collagen molecules in solutions. *Moscow University Phys. Bull.*, 2013, vol. 68, no. 2, pp. 154–158. DOI: 10.3103/S0027134913020094.
17. Petrova G. P. *Opticheskie spektral'nye metody issledovaniia zhidkostei i rastvorov: v 2 chastyah. Chast' 1* [Optical spectroscopic methods for study of liquids and solutions: in 2 parts. Part 1]. Moscow, Fizicheskii fakul'tet MGU [Faculty of Physics, Lomonosov Moscow State University], 2008. 71 p. (in Russian).

## Cite this article as:

Sergeeva I. A., Khitrina K. A., Krot A. R., Sukneva A. V., Petrova G. P. Investigation of the Interaction and Dynamics of Collagen and Collagenase Molecules in Solutions by Dynamic Light Scattering. *Izv. Saratov Univ. (N.S.), Ser. Physics*, 2017, vol. 17, iss. 3, pp. 171–178 (in Russian). DOI: 10.18500/1817-3020-2017-17-3-171-178.



УДК 53.06; 616-07; 535.3

## ДЕТЕКТИРОВАНИЕ КОНФОРМАЦИОННЫХ ИЗМЕНЕНИЙ АЛЬБУМИНА ПРИ ЕГО ГЛИКИРОВАНИИ И ТЕРМИЧЕСКОЙ ДЕНАТУРАЦИИ МЕТОДАМИ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ И МАЛОУГЛОВОГО РЕНТГЕНОВСКОГО РАССЕЯНИЯ



Н. Р. Ровнягина, Т. Н. Тихонова, Д. С. Молоденский, Е. А. Ширшин

Ровнягина Наталия Романовна, аспирант кафедры квантовой электроники, сотрудник, Международный лазерный центр, Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, n.rovnyagina2015@yandex.ru

Тихонова Татьяна Николаевна, кандидат физико-математических наук, младший научный сотрудник, Международный лазерный центр, Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, tikhonova@physics.msu.ru

Дмитрий Сергеевич Молоденский, кандидат физико-математических наук, научный сотрудник, Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», d.s.molodenskiy@yandex.ru

Ширшин Евгений Александрович, кандидат физико-математических наук, младший научный сотрудник кафедры квантовой электроники, Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, shirshin@lid.phyd.msu.ru

**Объект исследования.** Растворы бычьего сывороточного альбумина (БСА) и его агрегаты. **Цель работы.** Исследование структурных изменений молекул альбумина с помощью оптических и рентгеновских методик при их гликировании и термической денатурации, во время которых белок проходит через схожие интермедиаты. Исследование проведено для раствора БСА при pH 3 и pH 7.4. **Использованные методы и подходы.** Метод стационарной и время-разрешенной флуоресцентной спектроскопии, а также метод малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР). **Основные результаты.** Показано, что положение максимума и время затухания триптофановой флуоресценции чувствительны к конформационным перестройкам белка при инкубации при 65°C при pH 7.4. Обнаружено, что при гликировании значительным образом растет доступность гидрофобных сайтов связывания зонда Нильский красный. В результате термической денатурации БСА при pH 3 изменений вышеуказанных параметров не наблюдалось, однако методом МУРР для данной системы была обнаружена агрегация белка уже при температуре 25°C. Дальнейшая инкубация образца при температуре 65°C не приводит к изменению параметров окружения триптофановых остатков в белке и появлению/увеличению доступности гидрофобных сайтов связывания. Показано, что, несмотря на схожие промежуточные состояния, которые проходят рассматриваемые системы, структурные перестройки белка различны для гликированного и термически денатурированного/агрегированного альбумина.

**Ключевые слова:** гликирование, альбумин, термическая денатурация, конформация, расплавленная глобула, флуоресцентный зонд Нильский красный, тиофлавин Т, конечные

продукты гликирования,  $\pi$ -stacking, фибриллы, патологические состояния, социально значимые заболевания, флуоресцентная спектроскопия, малоугловое рентгеновское рассеяние.

DOI: 10.18500/1817-3020-2017-17-3-179-190

### Введение

Гликирование белков, в частности, основного транспортного белка плазмы крови – альбумина, является одним из центральных эффектов, лежащих в основе цепочки взаимосвязанных молекулярных процессов, сопутствующих различным социально значимым заболеваниям [1–3]. Функциональные свойства альбумина зависят от его конформации, нарушение которой может привести к потере им транспортных свойств [4]. В процессе гликирования происходит образование комплексов между свободными аминокетонами белка и глюкозой, при этом формируются конечные продукты гликирования. Данный процесс сопровождается необратимой структурной перестройкой молекулы, что также может изменить функции белков [5]. В организме здоровых людей скорость данной реакции настолько мала, что её продукты успевают удаляться. Однако при больших концентрациях глюкозы у больных диабетом реакция значительно ускоряется, продукты накапливаются и способны вызвать многочисленные нарушения функциональных свойств органов и тканей [6]. Более того, было показано, что у больных сахарным диабетом уровень гликированного альбумина увеличивается на 6–10% до 20–30% [7].

Наличие конечных продуктов гликирования в организме человека влечет за собой образование сшивков между белками с их последующей агрегацией [8]. В результате данного процесса возможно образование фибриллярных структур [9]. Фибриллы представляют собой нитевидные белковые агрегаты с продольными характерными размерами от сотен нанометров до микрометров [10], при этом они могут накапливаться в органах и тканях, приводя к их повреждению или дисфункции [11].



В связи с этим актуальным является исследование биохимических и биофизических процессов, сопутствующих гликированию. С точки зрения биомедицины наиболее интересной задачей является развитие экспрессных методов индикации патологических процессов, связанных с гликированием белков, для диагностики заболевания, в том числе на ранних его стадиях.

Известно, что в результате действия различных внешних факторов может начаться процесс денатурации белков. Например, при значительном изменении pH среды при  $\text{pH} < 2$  и  $\text{pH} > 11$  происходит заметное разворачивание молекулы [12]. Также широко изучена денатурация под действием температуры [13] и в результате связывания молекулы белка с различными ингибиторами [14]. В работе [15] рассматривается вероятность

конформационных перестроек альбумина на всех уровнях структурной организации белка при взаимодействии с поверхностью наноалмазов. Под действием различных внешних факторов с белками может происходить несколько разных процессов, в том числе агрегация [16], влекущая за собой образование токсичных высокомолекулярных структур. Было показано, что формирование фибрилл возможно в результате различных цепочек молекулярных процессов [12, 16, 17]. При этом вторичная структура белков изменяется принципиальным образом: увеличивается содержание  $\beta$ -структур, что является первым шагом для роста упорядоченных агрегатов [18]. Известно, например, что при pH 3 альбумин переходит в состояние расплавленной глобулы (рис. 1).

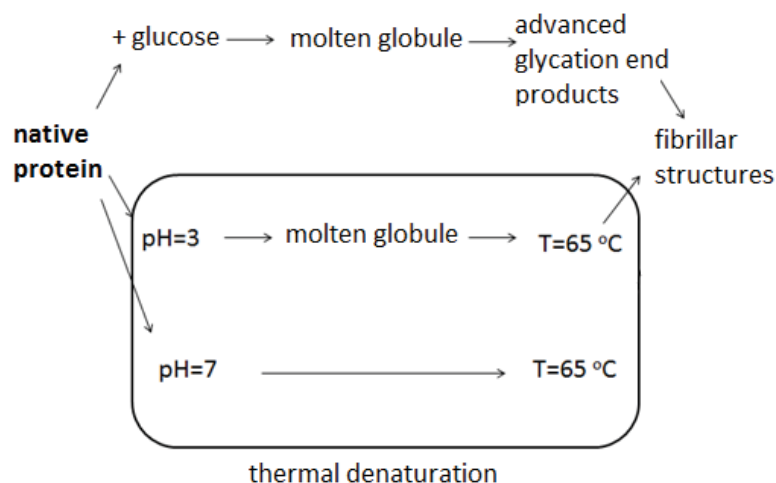


Рис. 1. Схематическое представление образования фибрилл из нативного белка при гликировании и при его термической денатурации

Fig. 1. Scheme of the fibrils formation from native protein during glycation and thermal denaturation

При дальнейшей инкубации альбумина при  $65^\circ\text{C}$  происходит процесс термической денатурации белка (см. рис. 1). Результатом данного процесса является образования фибрилл [19]. В рамках данного исследования была поставлена задача выявить особенности проявления конформационных изменений альбумина при гликировании и его термической денатурации методами флуоресцентной, абсорбционной спектроскопии и малоуглового рентгеновского рассеяния. Данные два процесса (гликирование и термическая денатурация) сравнивались, так как имеют одинаковые стадии конформационных изменений белка (нативный белок, состояние расплавленной глобулы, фибриллы).

В качестве подзадачи ставилось сравнение термической денатурации при pH 3 и при pH 7. Это было сделано для исследования структурных изменений в системах, проходящих различные интермедиаты, и для выявления чувствительности используемых методик при детектировании состояния расплавленной глобулы.

### Материалы и методы

#### Приготовление образцов

В работе использовались растворимый бычий сывороточный альбумин (БСА, код А1887 в каталоге Sigma, Германия) и глюкоза. Для приготовления растворов применялась бидистиллированная вода.





Образцы для экспериментов по гликированию готовились следующим образом: в буферный раствор Tris-HCl («РЕНАМ», Россия) с pH 7.4 добавлялись белок БСА с концентрацией  $[BSA] = 5 \cdot 10^{-6}$  М и глюкоза с концентрацией  $[Glu] = 50$  мМ. Также готовился образец сравнения без глюкозы. Затем образцы фильтровались с помощью фильтров фирмы Millipore с размером пор 0.2 мкм. Образцы хранились в течение 18 дней в термостате при температуре 37°C. Образцы готовились при pH 7.4.

В работе также использовались флуоресцентный зонд Нильский красный (код 298395 из каталога Sigma, Германия) с концентрацией  $[NR] = 9 \cdot 10^{-7}$  М и флуоресцентный зонд тиофлавин Т (ThT) (код T3516 из каталога Sigma, Германия) с концентрацией  $[ThT] = 2 \cdot 10^{-6}$  М.

Образцы для экспериментов по термической денатурации готовились следующим образом: использовалось два буферных раствора для приготовления образцов с pH 7.4 и 3 – буферный раствор Tris-HCl с концентрацией 50 мМ (pH 7.4) и буферный ацетатный раствор с концентрацией 50 мМ (pH 3) («AppliChem», Германия). В данные буферные растворы добавлялись белок БСА с концентрацией  $[BSA] = 5 \cdot 10^{-6}$  М и зонд Нильский красный с концентрацией  $[NR] = 9 \cdot 10^{-7}$  М. После этого образцы инкубировались при температуре 65°C в течение 24 часов. При этом температура образцов контролировалась термопарой.

#### *Абсорбционная спектроскопия*

Спектры поглощения были получены с помощью спектрофотометра Lambda 25 («Perkin Elmer», США) с возможностью оптических измерений в диапазоне 200–900 нм с разрешением 0.5 нм. Ошибка измерения прибора составляла менее 0.5%. Измерения производились в кварцевой кювете с длиной оптического пути 1 см и объемом образца 4 мл при постоянном перемешивании.

#### *Стационарная флуориметрия*

Спектры флуоресценции были получены с использованием спектрофлуориметра FluoroMax-4 фирмы Horiba Jobin-Yvon (Япония) с возможностью флуоресцентных измерений растворов в диапазоне 250–900 нм с разрешением 0.5 нм, источником излучения в данном приборе служит ксеноновая лампа мощностью 150 Вт. Ошибка измерения прибора для одного образца составляла менее 0.5%. Измерения производились в кварцевой кювете с длиной оптического пути 1 см и объемом образца 4 мл при постоянном перемешивании.

#### *Время-разрешенная флуоресцентная спектроскопия*

Для измерения кинетики затухания флуоресценции исследуемых растворов был использован несерийный флуориметр. Установка состояла из 16-канального мульти-анодного ФЭУ (PML-16, «Becker & Hickl», Берлин, Германия). Полихроматор был оснащен решеткой с разрешением 600 делений/мм, таким образом спектральная ширина детектируемой полосы составляла 200 нм (разрешение 12.5 нм/канал).

В качестве источника излучения использовался импульсный светодиод («Edinburgh Instruments», UK) с длительностью импульсов 700 пс, средней мощностью 0.8 мкВт, частотой повторения импульсов 10 МГц. Сбор данных для всех время-разрешенных флуоресцентных измерений белка проводился в течение 30 с, чтобы получить оптимальный сигнал для процедуры деконволюции. Кривые затухания триптофановой флуоресценции белка были получены с использованием канала, соответствующего длине волны 355 нм.

Кинетика затухания флуоресценции бычьего альбумина описывалась биэкспоненциальным законом:

$$F(t) = \sum_i a_i e^{-\frac{t}{\tau_i}}, \quad (1)$$

где  $a_i$  – предэкспоненциальный коэффициент, определяющий относительный вклад в кривую затухания компоненты с временем затухания  $\tau_i$ , для которого верно соотношение

$$\sum_i a_i = 1. \quad (2)$$

Среднее время жизни возбужденной молекулы определяется выражением

$$\langle \tau \rangle = \sum_i a_i \tau_i. \quad (3)$$

Наличие двух времен жизни связывают с вращательными конформерами триптофана [20, 21].

#### *Метод малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР)*

В малоугловом эксперименте пучок монохроматического рентгеновского излучения рассеивается после взаимодействия с электронами исследуемого образца. Рассеянная интенсивность как функция вектора рассеяния  $q = (4\pi/\lambda)\sin\theta$ , где  $2\theta$  – угол рассеяния, а  $\lambda$  – длина волны падающего излучения, дает информацию о флуктуациях электронной плотности



в однородной материи. В области малых  $q$  интенсивность рассеяния может быть выражена с помощью аппроксимации Гинье [22]:

$$I(q) \approx I(0)\exp(-q^2 R_g^2/3), \quad (4)$$

где  $R_g$  – радиус инерции взвешенных частиц в приближении монодисперсного раствора. Из (4) видно, что радиус инерции исследуемых частиц может быть определен с помощью построения так называемого графика Гинье ( $\log I(q)$  от  $q^2$ ) и определения угла наклона его линейной части. Важно отметить, что данная аппроксимация применима при выполнении условия  $qR_g \leq 1.3$  [22].

Помимо определения размеров взвешенных в растворе частиц, детальный анализ кривых малоуглового рассеяния позволяет также определять их форму с помощью метода виртуальных атомов [23]. Метод основан на моделировании структуры шариками нужной плотности и определении их пространственных координат с помощью программы минимизации невязки между экспериментальной и теоретической кривыми рассеяния. Теоретическая кривая при этом вычисляется по формуле суммирования Дебая, которая является точной, но требует значительных ресурсов машинного времени.

Измерения методом МУРР проводились на станции ДИКСИ курчатовского источника синхротронного излучения. Станция сконструирована по классической оптической схеме, включающей в себя три пары коллимирующих щелей, однокристалльный монохроматор ( $\lambda = 1.6 \text{ \AA}$ ), фокусирующее в вертикальной плоскости рентгеновское зеркало и двухкоординатный детектор Pilatus3 1M.

Расстояние образец–детектор на станции варьируется в зависимости от задачи вплоть до 2.4 м. Для того чтобы получить оптимальное разрешение по времени, расстояние между образцом и детектором было выбрано равным 0.5 м при времени экспозиции детектора 3 минуты на кадр. При данной геометрии съёмки модуль вектора рассеяния  $q$  варьировался в диапазоне от 0.2 до 4.2  $\text{nm}^{-1}$ .

Нагрев каждого образца в растворе производился в диапазоне от 25 до 70 °С с шагом 5 °С, время достижения теплового равновесия в каждой точке составляло 10 мин. Для каждого образца при каждой температуре снималась серия по 3 кадра для оценки влияния радиационных повреждений на кривую рассеяния. Для дополнительного контроля были произведены

измерения при фиксированной температуре в течение 60 мин, которые показали, что эффектом радиационного повреждения белка при комнатных температурах можно пренебречь.

## Результаты и их обсуждение

### 1. Конформационные изменения БСА при термической денатурации в системах, проходящих различные интермедиаты

В данной работе ставилась цель сравнить термическую денатурацию при pH 3 и при pH 7.4 для исследования структурных изменений в системах, проходящих различные промежуточные состояния, и для выявления чувствительности используемых методик при детектировании фибриллярных структур [24–26], а также состояния расплавленной глобулы [27].

Индикатором конформационных изменений белка может являться его триптофановая флуоресценция (рис. 2 *A, B*), так как триптофановые остатки чувствительны к изменениям своего микроокружения [28].

При термической денатурации белка в растворе при pH 7.4 происходит плавление белковой глобулы, приводящее к коротковолновому сдвигу спектра триптофановой флуоресценции (см. рис. 2, *A*). Данный факт может быть проинтерпретирован как следствие уменьшения полярности окружения триптофановых остатков в БСА [28]. Как видно из рис. 2, *B*, термическая инкубация альбумина при pH 3 при 65 °С не приводит к изменениям спектральных характеристик триптофановой флуоресценции, соответственно можно сделать вывод о том, что свойства микроокружения триптофановых остатков меняются слабо.

Вторым индикатором конформационных изменений белка являлось изменение флуоресценции гидрофобного зонда Нильский красный, эмиссия которого возрастает при встраивании его в области с низкой полярностью, например, в гидрофобные домены белков и их агрегатов [29]. На рис. 3, *A, B* представлены спектры флуоресценции зонда в присутствии БСА при pH 7.4 и pH 3 до и после температурного воздействия.

Видно, что в растворе термически денатурированного альбумина при pH 7.4 наблюдается коротковолновый сдвиг спектра флуоресценции зонда, что свидетельствует об изменении полярности его микроокружения – происходит его

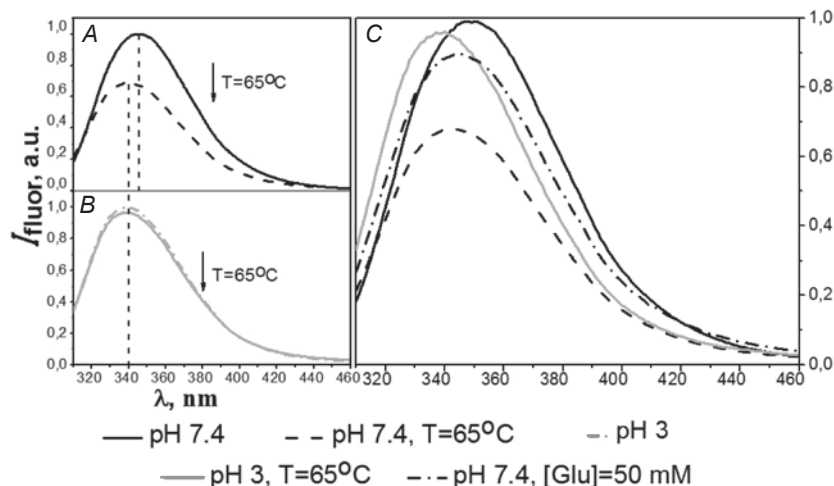


Рис. 2. Сравнение спектров собственной триптофановой флуоресценции БСА: *A* – при термической денатурации в растворе с pH 7.4, *B* – при термической денатурации в растворе с pH 3, *C* – при термической денатурации и при его гликировании, [БСА] =  $5 \cdot 10^{-6}$  М

Fig. 2. Comparison of spectra of intrinsic tryptophan fluorescence BSA, (*A*) – during thermal denaturation, pH 7.4, (*B*) – during thermal denaturation, pH 3, (*C*) – during thermal denaturation and glycation, [БСА] =  $5 \cdot 10^{-6}$  M

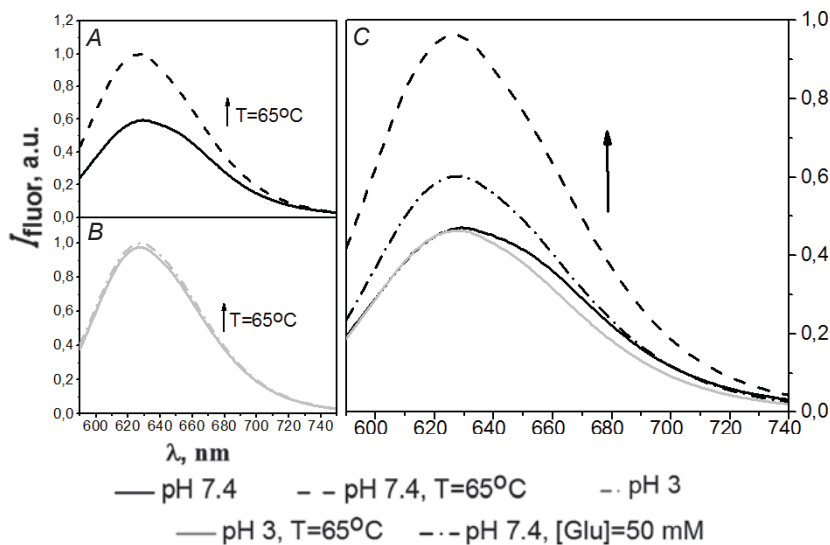


Рис. 3. Сравнение спектров флуоресценции зонда Нильский красный в комплексе: *A* – с термически денатурированным БСА в растворе с pH 7, *B* – с термически денатурированным БСА в растворе с pH 3, *C* – с термически денатурированным и гликированным БСА, [БСА] =  $5 \cdot 10^{-6}$  М, [NR] =  $9 \cdot 10^{-7}$  М

Fig. 3. Comparison of the Nile red fluorescence spectra in complex (*A*) with thermally denatured BSA, pH 7, (*B*) – with thermally denatured BSA, pH 3, (*C*) – with thermally denatured and glycated BSA, [БСА] =  $5 \cdot 10^{-6}$  M, [NR] =  $9 \cdot 10^{-7}$  M

встраивание в гидрофобные домены, которые, возможно, появляются между взаимодействующими белками, либо гидрофобные домены становятся более доступными для зонда [29, 30]. В растворе БСА при pH 3 после нагрева изменения

в оптических характеристиках и, следовательно, изменения в полярности микроокружения зонда не наблюдаются.

При анализе рассматриваемых систем, производимом методом абсорбционной спектро-



скопии (рис. 4, *A*), видно, что при термическом воздействии на раствор БСА+NR при pH 7.4 его оптическая плотность на всех длинах волн растёт, что с большой долей вероятности говорит о процессе образования агрегатов в данном образце. При инкубации БСА (pH 3) при 65°C

оптическая плотность раствора на всех длинах волн практически не меняется. Таким образом, метод абсорбционной спектроскопии не позволяет сделать вывод о наличии агрегатов в растворе БСА при pH 3 после термического воздействия.

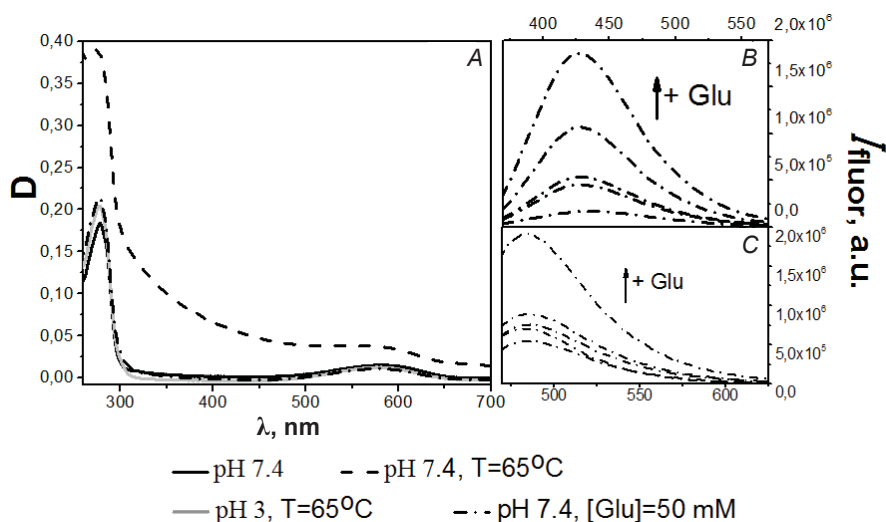


Рис. 4. Спектры поглощения образцов БСА+NR при их термической денатурации и при гликировании (*A*); спектры флуоресценции БСА при возбуждении на длине волны  $\lambda_{\text{ex}} = 350$  нм в растворе гликированного белка (*B*); спектры флуоресценции зонда тиофлавин Т в растворе гликированного белка (*C*),  $[\text{BCA}] = 5 \cdot 10^{-6}$  М,  $[\text{NR}] = 9 \cdot 10^{-7}$  М,  $[\text{ThT}] = 2 \cdot 10^{-6}$  М

Fig. 4. (*A*) – absorption spectra of BSA + NR samples under thermal denaturation and glycation, (*B*) – BSA fluorescence spectra of glycated protein solution under excitation at  $\lambda_{\text{ex}} = 350$  nm, (*C*) – thioflavin T fluorescence spectra in glycated protein solution,  $[\text{BCA}] = 5 \cdot 10^{-6}$  M,  $[\text{NR}] = 9 \cdot 10^{-7}$  M,  $[\text{ThT}] = 2 \cdot 10^{-6}$  M

Для того чтобы провести детальное исследование структурных изменений, происходящих с белком при термическом воздействии, было произведено исследование кинетики термической агрегации БСА в буферных растворах pH 3 и pH 7.4 методом МУРР. На рис. 5, *A* показана температурная зависимость рассчитанного с помощью аппроксимации Гинье средневзвешенного по ансамблю частиц радиуса инерции молекул белка.

Из рис. 5, *A* видно, что в растворе альбумина, находящемся при pH 7.4, при нагреве до 50 °C заметных структурных перестроек молекулы белка не происходит. При дальнейшем увеличении температуры, однако, наблюдается резкий скачок значения радиуса инерции в области температуры плавления белка (65 °C), что связано с изменением конформации белка и образованием агрегатов. Напротив, в раство-

ре БСА при pH 3 уже при малых температурах (~30 °C) наблюдается рост средневзвешенного радиуса инерции частиц, что говорит об образовании агрегатов белка. Данный факт можно объяснить тем, что молекула альбумина при pH 3 находится в состоянии расплавленной глобулы [31], в результате чего ее стабильность является пониженной и соответственно процесс агрегации запускается спонтанно уже при низких (ниже температуры плавления нативного белка) температурах.

Согласно шариковой модели молекулы альбумина в растворе с pH 3 разворачивание белковой глобулы в цепочку происходит уже при комнатной температуре (см. рис. 5, *C*). Белок БСА состоит из трех доменов, которые могут изменять свое относительное положение в пространстве в зависимости от параметров



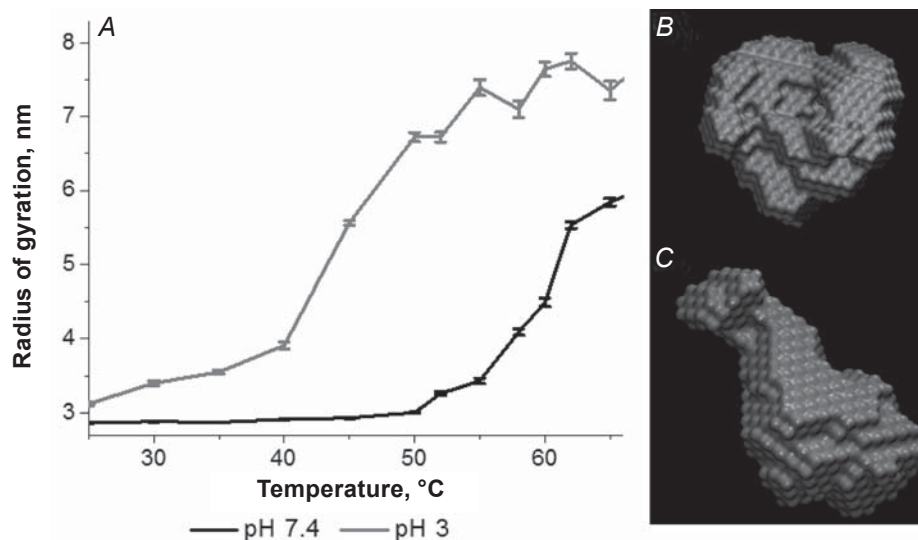


Рис. 5. Зависимость среднего радиуса инерции молекулы БСА от температуры раствора альбумина при pH 3 и pH 7.4 (A); шариковая модель, построенная методом виртуальных атомов до температурного воздействия: B – молекулы альбумина в растворе с pH 7.4, C – молекулы альбумина в растворе с pH 3. [БСА] =  $5 \cdot 10^{-6}$  М

Fig. 5. (A) – dependence of average gyration radius of the BSA molecule on the temperature, pH 3 and pH 7.4; model was constructed using virtual atoms method, (B) – albumin molecules before heating, pH 7.4, (C) – albumin molecules, pH 3. [БСА] =  $5 \cdot 10^{-6}$  М

окружения. Наши шариковые модели могут быть применены для оценки происходящей в растворе молекулярной тектоники и интерпретированы как выстраивание трех доменов БСА вдоль одной оси. Для сравнения, при pH 7.4 белок имеет классическую глобулярную форму в виде сердца (heart-shaped) (см. рис. 5, B) [32]. Стоит отметить, что полученные данные хорошо согласуются с литературными (см., например, [33]), где авторы также отмечают разворачивание сывороточного альбумина человека в цепочку при понижении pH раствора.

Стоит отметить, что в отличие от метода стационарной флуоресцентной и абсорбционной спектроскопии, не показывающих радикальных конформационных изменений при термическом воздействии на раствор БСА (см. рис. 3, A), находящегося в состоянии расплавленной глобулы (pH 3), метод МУРР является более чувствительным к структурным изменениям молекул в растворе альбумина. Иными словами, образование агрегатов в растворе с pH 3 не приводит ни к изменению полярности окружения триптофановых остатков в белке (рис. 2, B), ни к появлению новых доступных гидрофобных сайтов или экспонированию гидрофобных сайтов в растворитель (соответственно неизменными остаются оптические характеристики гидрофобного зонда

NR, см. рис. 3, B). Таким образом, несмотря на то что в системе имеют место конформационные перестройки молекулы и межмолекулярные взаимодействия, их наличие не проявляется в оптических свойствах использованных флуоресцентных индикаторов.

## 2. Конформационные изменения БСА при гликировании и термической денатурации

В работе было также произведено сравнение конформационных изменений альбумина при его гликировании и при его термической денатурации/агрегации. На рис. 2, C представлены спектры собственной флуоресценции БСА: 1) при pH 7.4 (в нативном состоянии); 2) при его термической денатурации при pH 7.4,  $T = 65$  °C; 3) при термической денатурации при pH 3; 4) при гликировании (pH 7.4).

Как видно из рис. 2, C, гликирование альбумина не приводит к изменению полярности окружения триптофановых остатков, поскольку положение максимума полосы собственной флуоресценции остается неизменным. При этом при гликировании БСА наблюдается заметный рост флуоресцентной полосы, обусловленной наличием конечных продуктов гликирования (см. рис. 4, B), что является подтверждением успешного хода процесса гликирования. Данные факты



находятся в соответствии с литературными данными [8]. В то же время из рис. 3, С видно, что при гликировании альбумина наблюдается рост флуоресценции зонда Нильский красный, что говорит об увеличении доступности гидрофобных сайтов связывания. Более того, исследования, проведенные с использованием флуоресцентного зонда тиофлавин Т, являющегося специфичным маркером образования фибриллярных структур [34], показали увеличение интенсивности его флуоресценции при гликировании БСА (см. рис. 4, С), что может быть интерпретировано

как образование фибриллоподобных агрегатов или увеличение доли  $\beta$ -структур в белке. Первое предположение находится в соответствии с литературными данными [35].

### 3. Исследование конформационных изменений гликированного и термически денатурированного белка с использованием метода время-разрешенной флуориметрии

В данной работе было произведено измерение кинетик затухания собственной триптофановой флуоресценции белка при термической денатурации и при его гликировании (рис. 6).

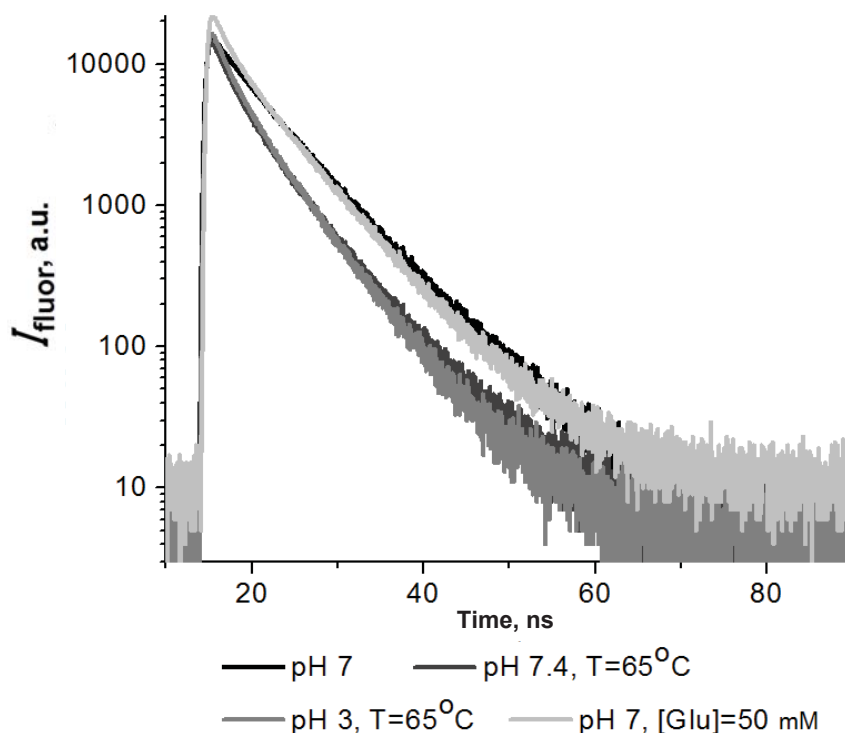


Рис. 6. Кинетики затухания флуоресценции БСА при термической денатурации и при его гликировании. Длина волны возбуждения  $\lambda_{ex} = 280$  нм

Fig. 6. BSA fluorescence decay kinetics under thermal denaturation and glycation. Excitation wavelength  $\lambda_{ex} = 280$  nm

После анализа полученных результатов были определены относительные амплитуды и средние времена жизни возбужденной молекулы для смеси растворов БСА+зонд pH 3, pH 7.4 при термическом воздействии и при инкубации БСА с глюкозой в течение 18 дней. Результаты представлены в таблице.

Определенные времена жизни флуоресценции БСА при pH 7.4 находятся в согласии с литературными данными [36]. При термической агрегации нативного белка среднее время жизни

падает с 5.5 до 4 нс. При этом время жизни белка при pH 3 до и после нагрева практически не меняется и составляет 3.8 и 3.7 нс соответственно. Данный факт может быть объяснен тем, что в состоянии расплавленной глобулы при pH 3 молекула белка уже претерпела существенные конформационные изменения, и дальнейшее температурное воздействие приводит к более слабому изменению микроокружения триптофановых остатков по сравнению с термической денатурацией при pH 7.4. Аналогично при гликировании



Параметры, полученные при аппроксимации кинетики затухания флуоресценции БСА  
Parameters obtained by approximating of the BSA fluorescence decay kinetics

Образец Sample	Времена жизни флуоресценции, нс Fluorescence lifetime, ns	Относительные амплитуды, % Relative amplitudes, %	Среднее время жизни, нс Average lifetime, ns	$\chi^2$ (невязка) Discrepancy
BSA, pH 7.4	$\tau_1 = 3.1 \pm 0.1$ $\tau_2 = 6.7 \pm 0.4$	$a_1 = 49.4 \pm 2.1$ $a_2 = 50.6 \pm 2.5$	$\langle \tau \rangle = 5.5 \pm 0.3$	1.98
BSA, pH=7.4, T=65 °C	$\tau_1 = 2.7 \pm 0.1$ $\tau_2 = 6.4 \pm 0.3$	$a_1 = 65.9 \pm 2.6$ $a_2 = 34.1 \pm 1.9$	$\langle \tau \rangle = 4.0 \pm 0.2$	1.45
BSA, pH=3	$\tau_1 = 2.6 \pm 0.1$ $\tau_2 = 5.7 \pm 0.3$	$a_1 = 61.3 \pm 2.5$ $a_2 = 38.7 \pm 2.0$	$\langle \tau \rangle = 3.8 \pm 0.1$	1.75
BSA, pH=3, T=65 °C	$\tau_1 = 2.5 \pm 0.1$ $\tau_2 = 5.5 \pm 0.3$	$a_1 = 59.5 \pm 2.4$ $a_2 = 40.5 \pm 2.4$	$\langle \tau \rangle = 3.7 \pm 0.1$	1.6
Гликированный БСА, pH 7.4	$\tau_1 = 2.6 \pm 0.1$ $\tau_2 = 6.4 \pm 0.3$	$a_1 = 48.0 \pm 2.0$ $a_2 = 52.0 \pm 2.2$	$\langle \tau \rangle = 5.3 \pm 0.3$	1.96

альбумина не наблюдается изменений времени жизни флуоресценции (см. таблицу). В целом наблюдаемые тренды находятся в соответствии с изменениями стационарных флуоресцентных характеристик триптофановых остатков.

#### Заключение

В данной работе методами стационарной и время-разрешенной флуоресцентной и абсорбционной спектроскопии, а также методом малоуглового рентгеновского рассеяния были показаны различные проявления структурных изменений альбумина при гликировании и термической денатурации. В частности, молекула белка в растворе при pH 3 еще до термического воздействия теряет свою нативную конформацию и полностью разворачивается. Было показано, что процесс образования агрегатов в данном растворе запускается спонтанно еще до нагрева.

При термическом воздействии на молекулу БСА в растворе с pH 7.4 происходит структурная перестройка белка, а именно уменьшение полярности микроокружения триптофановых остатков и увеличение доступности гидрофобных доменов. Вследствие температурных воздействий молекулы нативного альбумина ассоциируют в аморфные агрегаты.

При гликировании альбумин также проходит состояние расплавленной глобулы, однако не происходит изменения полярности микроокружения триптофановых остатков, значительным образом растет доступность гидрофобных сайтов связывания БСА, альбумин агрегирует с образованием структур, обогащенных  $\beta$ -листами. Таким

образом, в данной работе было показано, что, несмотря на схожие промежуточные состояния, которые проходят рассматриваемые системы, структурные перестройки белка различны для гликированного и термически денатурированного/агрегированного альбумина.

#### Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проекты № 16-32-60168, 16-32-00049) и Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере (проект № 7372ГУ/2015).

#### Список литературы

1. Liggins J., Furth A. Role of protein-bound carbonyl groups in the formation of advanced glycation endproducts // *Biochim. Biophys. Acta*. 1997. Vol. 1361. P. 123–130.
2. Suarez G., Rajaram R. Nonenzymatic glycation of bovine serum albumin by fructose (fructation). Comparison with the Maillard reaction initiated by glucose // *Biol. Chem.* 1989. Vol. 264. P. 3674–3679.
3. Monnier V. M., Sell D. R. Maillard Reaction-Mediated Molecular Damage to Extracellular Matrix and Other Tissue Proteins in Diabetes, Aging, and Uremia // *Diabetes* 1992. Vol. 21. P. 36–41.
4. Tikhonova T. N., Shirshin E. A., Budylin G. S., Fadeev V. V., Petrova G. P. Assessment of the Europium (III) Binding Sites on Albumin Using Fluorescence Spectroscopy // *J. Phys. Chem.* 2014. Vol. 118. P. 6626–6633.
5. Zhdanova N. G., Shirshin E. A., Maksimov E. G., Panchishin I. M., Saletsky A. M., Fadeev V. V. Tyrosine fluorescence probing of the surfactant-induced conformational changes of albumin // *Photochem. Photobiol. Sci.* 2015. Vol. 14. P. 897–908.



6. Mendez D. L., Jensen R. A. The effect of non-enzymatic glycation on the unfolding of human serum albumin // Arch. Biochem. Biophys. 2005. Vol. 444. P. 92–99.
7. Nakajou K., Watanabe H., Kragh-Hansen U., Maruyama T., Otagiri M. The effect of glycation on the structure, function and biological fate of human serum albumin as revealed by recombinant mutants // Biochim. Biophys. Acta. 2003. Vol. 1623. P. 88–97.
8. Obayashi H., Nakano K. Formation of Crossline as a Fluorescent Advanced Glycation End Product *in vitro* and *in vivo* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1996. Vol. 226. P. 37–41.
9. Odetti P., Aragno I., Rolandi R., Garibaldi S., Valentini S., Cosso L., Traverso N., Cottalasso D., Pronzato M. A., Marinari U. M. Scanning force microscopy reveals structural alterations in diabetic rat collagen fibrils : role of protein glycation // Diabetes/metabolism research and reviews. 2000. Vol. 16. P. 74–81.
10. Adamcik J., Jung J.-M., Flakowski J., De Los Rios P., Dietler G., Mezzenga R. Understanding amyloid aggregation by statistical analysis of atomic force microscopy images // Nature Nanotech. 2010. Vol. 5. P. 423–428.
11. Ross C. A., Poirier M. A. Protein aggregation and neurodegenerative disease // Nature Med. 2004. Vol. 10. P. S10–S17.
12. Lin V. J. C., Koenig J. L. Raman studies of bovine serum albumin // Biopolymers. 1976. Vol. 15. P. 203–218.
13. Hayakawa I., Kajikara J., Morikawa K., Oda M., Fujio Y. Denaturation of bovine serum albumin (BSA) and ovalbumin by high pressure, heat and chemicals // J. Food Sci. 1992. Vol. 57. P. 288–292.
14. Brandt N. N., Chikishev A. Yu., Mankova A. A., Sakodynskaya I. K. Effect of thermal denaturation, inhibition, and cleavage of disulfide bonds on the low-frequency Raman and FTIR spectra of chymotrypsin and albumin // J. Biomed. Optics. 2015. Vol. 20. P. 051015-1-051015-6.
15. Svetlakova A. S., Brandt N. N., Priezzhev A. V., Chikishev A. Yu. Raman microspectroscopy of nanodiamond-induced structural changes in albumin // J. Biomed. Optics. 2015. Vol. 20. P. 047004-1–047004-5.
16. Vetri V., Librizzi F., Leone M., Militello V. Thermal aggregation of bovine serum albumin at different pH : comparison with human serum albumin // Eur. Biophys. J. 2006. Vol. 36. P. 717–725.
17. Shang L., Wang Y. pH-Dependent Protein Conformational Changes in Albumin : Gold Nanoparticle Bioconjugates : A Spectroscopic Study // Langmuir. 2007. Vol. 23. P. 2714–2721.
18. Wahl M. Time-Correlated Single Photon Counting. URL: <http://www.picoquant.com> (дата обращения: 14.01.2017).
19. Bhattacharya M., Jain N., Mukhopadhyay S. Insights into the Mechanism of Aggregation and Fibril Formation from Bovine Serum Albumin // J. Phys. Chem. 2011. Vol. 115. P. 4195–4205.
20. Лакович Дж. Основы флуоресцентной спектроскопии. М. : Мир, 1986. 496 с.
21. Szabo A. G., Rayner D. M. Fluorescence Decay of Tryptophan Conformers in Aqueous Solution // J. Amer. Chem. Soc. 1980. Vol. 102. P. 554–563.
22. Guinier A., Fournet G. Small angle scattering of X-rays // J. Polym. Sci. 1955. Vol. 1. P. 268.
23. Franke D., Svergun D. I. DAMMIF, a program for rapid ab-initio shape determination in small-angle scattering // J. Appl. Cryst. 2009. Vol. 42. P. 342–346.
24. Blake C., Serpell L. Synchrotron X-ray studies suggest that the core of the transthyretin amyloid fibril is a continuous  $\beta$ -sheet helix // Structure. 1996. Vol. 4. P. 989–998.
25. Wu C., Wang Z., Lei H., Zhang W., Duan Y. Dual binding modes of Congo red to amyloid protofibril surface observed in molecular dynamics simulations // J. Amer. Chem. Soc. 2007. Vol. 129. P. 1225–1232.
26. Biancalana M., Makabe K., Koide A., Koide S. Aromatic cross-strand ladders control the structure and stability of  $\beta$ -rich peptide self-assembly mimics // J. Mol. Biol. 2008. Vol. 383. P. 205–213.
27. Yang J., Dunker A. K., Powers J. R., Clark S., Swanson B. G.  $\beta$ -Lactoglobulin molten globule induced by high pressure // J. Agric. Food. Chem. 2001. Vol. 49. P. 3236–3243.
28. Sulkowska A. Interaction of drugs with bovine and human serum albumin // Mol. Struct. 2002. Vol. 614. P. 227–232.
29. Tajalli H., Gilani A. G., Zakerhamidi M. S., Tajalli P. The photophysical properties of Nile red and Nile blue in ordered anisotropic media // Dyes and Pigments. 2008. Vol. 78. P. 15–24.
30. Okamoto A., Tainaka K., Fujiwara Y. Nile Red nucleoside : Design of a solvatofluorochromic nucleoside as an indicator of micropolarity around DNA // J. Org. Chem. 2006. Vol. 71. P. 3592–3598.
31. Muzammil S., Kumar Y., Tayyab S. Molten globule-like state of human serum albumin at low pH // FEBS. 1999. Vol. 266. P. 26–32.
32. Leggio C., Galantini L., Pavel N. V. About the albumin structure in solution : cigar Expanded form versus heart Normal shape // Phys. Chem. Chem. Phys. 2008. Vol. 10. P. 6741–6750.
33. Olivieri J. R., Craievich A. F. The subdomain structure of human serum albumin in solution under different pH conditions studied by small angle x-ray scattering // Eur. Biophys. J. 1995. Vol. 24. P. 77–84.
34. Krebs M. R. H., Bromley E. H. C., Donald A. M. The binding of thioflavin-T to amyloid fibrils : localisation and implications // J. Struct. Biol. 2005. Vol. 149. P. 30–37.
35. Bouma B., Kroon-Batenburg L. M., Wu Y. P., Brünjes B., Posthuma G., Kranenburg O., Gebbink M. F. Glycation induces formation of amyloid cross- $\beta$  structure in albumin // J. Biol. Chem. 2003. Vol. 278. P. 41810–41819.
36. Togashi D. M., Ryder A. G., Mc Mahon D., Dunne P., McManus J. Fluorescence study of Bovine Serum Albumin and Ti and Sn Oxide Nanoparticles Interactions // Diagnostic Optical Spectroscopy in Biomedicine IV / eds. D. Schweitzer, M. Fitzmaurice. Proc. of SPIE-OSA Biomedical Optics, SPIE Vol. 6628, 66281K, 2007 (11 p.).



**Образец для цитирования:**

Ровнягина Н. Р., Тихонова Т. Н., Молоденский Д. С., Ширшин Е. А. Детектирование конформационных изменений альбумина при его гликировании и термической денатурации методами флуоресцентной спектроскопии и малоуглового рентгеновского рассеяния // Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Физика. 2017. Т. 17, вып. 3. С. 179–190. DOI: 10.18500/1817-3020-2017-17-3-179-190.

**Albumin Conformational Changes During Glycation and Thermal Denaturation Processes Revealed by Fluorescence Spectroscopy and Small-angle X-ray Scattering**

**N. R. Rovnyagina, T. N. Tikhonova, D. S. Molodenskiy, E. A. Shirshin**

Nataliya R. Rovnyagina, ORCID 0000-0002-6729-3245, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory, Moscow, 119991, Russia, n.rovnyagina2015@yandex.ru

Tatiana N. Tikhonova, ORCID 0000-0003-2639-9163, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory, Moscow, 119991, Russia, tikhonova@physics.msu.ru

Dmitry S. Molodenskiy, ORCID 0000-0002-5954-4294, National Research Centre Kurchatov Institute, Sq. Akademika Kurchatova, 1, Moscow, 123098, Russia, d.s.molodenskiy@yandex.ru

Evgeny A. Shirshin, ORCID 0000-0002-5514-3557, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory, Moscow, 119991, Russia, shirshin@lid.phys.msu.ru

**Background and Objectives:** Objects of the research in this study are solutions of bovine serum albumin (BSA) and its aggregates. Structural changes of the protein molecules in solution with pH 3 and pH 7.4 are investigated during glycation and thermal denaturation processes, when the BSA molecules in solution undergo similar intermediate states. The main aim of the research is to compare structural changes of the BSA upon its glycation and thermal denaturation, revealed by combination of optical and X-ray techniques. **Materials and Methods:** The main techniques used in this study were steady-state and time-resolved fluorescence spectroscopy, as well as small angle X-ray scattering (SAXS). **Results:** Position of maximum in tryptophan fluorescence spectrum and tryptophan fluorescence lifetime are sensitive to BSA conformational changes at pH 7.4 upon its incubation at 65°C. Availability of hydrophobic binding sites of NR significantly increases upon glycation. No alterations of these photophysical parameters are observed at pH 3. However, SAXS experiments reveal presence of BSA aggregates at 25°C and above. Further incubation of the solution at 65°C is not accompanied by changes in the local environment of tryptophan residues or appearance/accessibility enhancement of hydrophobic sites in the protein structure. **Conclusion:** This study shows that structural changes of the BSA molecules differ for glycated and thermally denatured / aggregated proteins, though the molecules undergo similar intermediate states during these processes.

**Key words:** glycation, albumin, thermal denaturation, conformation, molten globule, Nile Red, thioflavin T, AGEs (advanced glycation end-products),  $\pi$ -stacking, fibrils, pathological conditions, socially important diseases, fluorescence spectroscopy, Small Angle X-ray Scattering.

**Acknowledgements:** This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (projects nos. 16-32-60168, 16-32-00049) and the Assistance Foundation for Small Innovative Enterprises Development in Science and Technology (project no. 7372 GU/2015).

**References**

1. Liggins J., Furth A. Role of protein-bound carbonyl groups in the formation of advanced glycation endproducts. *Biochim. Biophys. Acta*, 1997, vol. 1361, pp. 123–130.
2. Suarez G., Rajaram R. Nonenzymatic glycation of bovine serum albumin by fructose (fructation). Comparison with the Maillard reaction initiated by glucose. *Biol. Chem.*, 1989, vol. 264, pp. 3674–3679.
3. Monnier V. M., Sell D. R. Maillard Reaction-Mediated Molecular Damage to Extracellular Matrix and Other Tissue Proteins in Diabetes, Aging, and Uremia. *Diabetes*, 1992, vol. 21, pp. 36–41.
4. Tikhonova T. N., Shirshin E. A., Budylin G. S., Fadeev V. V., Petrova G. P. Assessment of the Europium (III) Binding Sites on Albumin Using Fluorescence Spectroscopy. *J. Phys. Chem.*, 2014, vol. 118, pp. 6626–6633.
5. Zhdanova N. G., Shirshin E. A., Maksimov E. G., Panchishin I. M., Saletsky A. M., Fadeev V. V. Tyrosine fluorescence probing of the surfactant-induced conformational changes of albumin. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2015, vol. 14, pp. 897–908.
6. Mendez D. L., Jensen R. A. The effect of non-enzymatic glycation on the unfolding of human serum albumin. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2005, vol. 444, pp. 92–99.
7. Nakajou K., Watanabe H., Kragh-Hansen U., Maruyama T., Otagiri M. The effect of glycation on the structure, function and biological fate of human serum albumin as revealed by recombinant mutants. *Biochim. Biophys. Acta*, 2003, vol. 1623, pp. 88–97.
8. Obayashi H., Nakano K. Formation of Crossline as a Fluorescent Advanced Glycation End Product *in vitro* and *in vivo*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1996, vol. 226, pp. 37–41.
9. Odetti P., Aragno I., Rolandi R., Garibaldi S., Valentini S., Cosso L., Traverso N., Cottalasso D., Pronzato M. A., Marinari U. M. Scanning force microscopy reveals structural alterations in diabetic rat collagen fibrils: role of protein glycation. *Diabetes/metabolism research and reviews*, 2000, vol. 16, pp. 74–81.
10. Adamcik J., Jung J.-M., Flakowski J., De Los Rios P., Dietler G., Mezzenga R. Understanding amyloid aggregation by statistical analysis of atomic force microscopy images. *Nature Nanotech.*, 2010, vol. 5, pp. 423–428.



11. Ross C.A., Poirier M.A. Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nature Med.*, 2004, vol. 10, pp. S10–S17.
12. Lin V. J. C., Koenig J. L. Raman studies of bovine serum albumin. *Biopolymers*, 1976, vol. 15, pp. 203–218.
13. Hayakawa I., Kajikara J., Morikawa K., Oda M., Fujio Y. Denaturation of bovine serum albumin (BSA) and ovalbumin by high pressure, heat and chemicals. *J. Food Sci.*, 1992, vol. 57, pp. 288–292.
14. Brandt N. N., Chikishev A. Yu., Mankova A.A., Sakodinskaya I. K. Effect of thermal denaturation, inhibition, and cleavage of disulfide bonds on the low-frequency Raman and FTIR spectra of chymotrypsin and albumin. *J. Biomed. Optics.*, 2015, vol. 20, pp. 051015-1–051015-6.
15. Svetlakov A. S., Brandt N. N., Priezzhev A. V., Chikishev A. Yu. Raman microspectroscopy of nanodiamond-induced structural changes in albumin. *J. Biomed. Optics*, 2015, vol. 20, pp. 047004-1–047004-5.
16. Vetri V., Librizzi F., Leone M., Militello V. Thermal aggregation of bovine serum albumin at different pH: comparison with human serum albumin. *Eur. Biophys J.*, 2006, vol. 36, pp. 717–725.
17. Shang L., Wang Y. pH-Dependent Protein Conformational Changes in Albumin : Gold Nanoparticle Bioconjugates: A Spectroscopic Study. *Langmuir*, 2007, vol. 23, pp. 2714–2721.
18. Wahl M. *Time-Correlated Single Photon Counting*. Available at: <http://www.picoquant.com> (accessed 14 January 2017).
19. Bhattacharya M., Jain N., Mukhopadhyay S. Insights into the Mechanism of Aggregation and Fibril Formation from Bovine Serum Albumin. *J. Phys. Chem.*, 2011, vol. 115, pp. 4195–4205.
20. Lakovich Dzh. *Osnovy fluorestsentnoi spektroskopii* [Fundamentals of fluorescence spectroscopy]. Moscow, Mir, 1986. 496 p. (in Russian).
21. Szabo A. G., Rayner D. M. Fluorescence Decay of Tryptophan Conformers in Aqueous Solution. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1980, vol. 102, pp. 554–563.
22. Guinier A., Fournet G. Small angle scattering of X-rays. *J. Polym. Sci.*, 1955, vol. 1, p. 268.
23. Franke D., Svergun D. I. DAMMIF, a program for rapid ab-initio shape determination in small-angle scattering. *J. Appl. Cryst.*, 2009, vol. 42, pp. 342–346.
24. Blake C., Serpell L. Synchrotron X-ray studies suggest that the core of the transthyretin amyloid fibril is a continuous  $\beta$ -sheet helix. *Structure*, 1996, vol. 4, pp. 989–998.
25. Wu C., Wang Z., Lei H., Zhang W., Duan Y. Dual binding modes of Congo red to amyloid protofibril surface observed in molecular dynamics simulations. *J. Amer. Chem. Soc.*, 2007, vol. 129, pp. 1225–1232.
26. Biancalana M., Makabe K., Koide A., Koide S. Aromatic cross-strand ladders control the structure and stability of  $\beta$ -rich peptide self-assembly mimics. *J. Mol. Biol.*, 2008, vol. 383, pp. 205–213.
27. Yang J., Dunker A. K., Powers J. R., Clark S., Swanson B. G.  $\beta$ -Lactoglobulin molten globule induced by high pressure. *J. Agric. Food. Chem.*, 2001, vol. 49, pp. 3236–3243.
28. Sulkowska A. Interaction of drugs with bovine and human serum albumin. *Mol. Struct.*, 2002, vol. 614, pp. 227–232.
29. Tajalli H., Gilani A. G., Zakerhamidi M. S., Tajalli P. The photophysical properties of Nile red and Nile blue in ordered anisotropic media. *Dyes and Pigments*, 2008, vol. 78, pp. 15–24.
30. Okamoto A., Tainaka K., Fujiwara Y. Nile Red nucleoside: Design of a solvatofluorochromic nucleoside as an indicator of micropolarity around DNA. *J. Org. Chem.*, 2006, vol. 71, pp. 3592–3598.
31. Muzammil S., Kumar Y., Tayyab S. Molten globule-like state of human serum albumin at low pH. *FEBS*, 1999, vol. 266, pp. 26–32.
32. Leggio C., Galantini L., Pavel N. V. About the albumin structure in solution: cigar Expanded form versus heart Normal shape. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2008, vol. 10, pp. 6741–6750.
33. Olivieri J. R., Craievich A. F. The subdomain structure of human serum albumin in solution under different pH conditions studied by small angle x-ray scattering. *Eur. Biophys. J.*, 1995, vol. 24, pp. 77–84.
34. Krebs M. R. H., Bromley E. H. C., Donald A. M. The binding of thioflavin-T to amyloid fibrils: localisation and implications. *J. Struct. Biol.*, 2005, vol. 149, pp. 30–37.
35. Bouma B., Kroon-Batenburg L. M., Wu Y. P., Brünjes B., Posthuma G., Kranenburg O., Gebbink M. F. Glycation induces formation of amyloid cross- $\beta$  structure in albumin. *J. Biol. Chem.*, 2003, vol. 278, pp. 41810–41819.
36. Togashi D. M., Ryder A. G., Mc Mahon D., Dunne P., McManus J. Fluorescence Study of Bovine Serum Albumin and Ti and Sn Oxide Nanoparticles Interactions. *Diagnostic Optical Spectroscopy in Biomedicine IV*. Eds. D. Schweitzer, M. Fitzmaurice, Proc. of SPIE-OSA Biomedical Optics, SPIE Vol. 6628, 66281K, 2007 (11 p.).

**Cite this article as:**

Rovnyagina N. R., Tikhonova T. N., Molodenskiy D. S., Shirshin E. A. Albumin Conformational Changes During Glycation and Thermal Denaturation Processes Revealed by Fluorescence Spectroscopy and Small-angle X-ray Scattering. *Izv. Saratov Univ. (N.S.), Ser. Physics*, 2017, vol. 17, iss. 3, pp. 179–190 (in Russian). DOI: 10.18500/1817-3020-2017-17-3-179-190.



УДК 004.932

## ЭФФЕКТ «ВЫСВЕЧИВАНИЯ» ЛЕЙКОЦИТОВ И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ КЛЕТОК КРОВИ МЕТОДОМ ЦИФРОВОЙ МИКРОСКОПИИ

В. А. Дубровский, С. О. Торбин



Дубровский Валерий Александрович, кандидат физико-математических наук, доцент, заведующий кафедрой медбиофизики имени В. Д. Зёрнова, Саратовский государственный медицинский университет имени В. И. Разумовского, [doubrovski43@yandex.ru](mailto:doubrovski43@yandex.ru)

Торбин Станислав Олегович, ассистент кафедры медбиофизики имени В. Д. Зёрнова, Саратовский государственный медицинский университет имени В. И. Разумовского, [stanislav.torbin@yandex.ru](mailto:stanislav.torbin@yandex.ru)

**Цель работы.** Поиск способа идентификации и счета лейкоцитов в пробе нативной крови. **Материалы и оборудование.** Цельная донорская кровь, цифровой микроскоп. **Методы и подходы.** Разработка способа идентификации и счета лейкоцитов нативной крови проведено на основе метода цифровой микроскопии. **Основные результаты.** Экспериментально обнаружен эффект «высвечивания» лейкоцитов в пробе нативной крови при ее наблюдении с помощью цифрового микроскопа. Эффект заключается в том, что при удалении объектива микроскопа, изначально сфокусированного на объекте, от лейкоцита происходит трансформация его изображения, причем яркость изображения клетки повышается. В то же время подобное явление не наблюдается для эритроцитов и тромбоцитов, что позволяет отличить лейкоцит от иных форменных элементов крови при их подсчете. Обнаруженный эффект не наблюдается ни на одном типе форменных элементов крови в случае мазков. Экспериментально показано, что в основе обнаруженного эффекта лежит «линзовый» механизм. Проведены статистические исследования на множестве клеток нативной крови. Показано, что применение эффекта «высвечивания» лейкоцитов дает значительное увеличение точности счета клеток этого типа при анализе формулы нативной крови методом цифровой микроскопии.

**Ключевые слова:** форменные элементы крови, лейкоцит, счет клеток, цифровая микроскопия.

DOI: 10.18500/1817-3020-2017-17-3-191-200

### Введение

Определение количества форменных элементов крови разного типа является важной задачей лабораторной диагностики. Исторически идентификация и счет клеток крови производились с использованием микроскопа в «ручном» режиме. Развитие оптической проточной цитометрии привело к появлению автоматов для идентификации и счета форменных элементов крови, например, [1–4]. Проточные гемоцитометры позволяют производить подсчет клеток крови в потоке поштучно, они нашли применение и для решения иных диагностических задач, в частности, для определения групповой принадлежности крови [5–8].

В последние годы интенсивно развивается иной подход к идентификации и счету форменных элементов крови – метод цифровой микроскопии. Этот метод основан на компьютерной обработке фотоизображений образцов крови. Отметим, что в качестве анализируемых объектов исследователи в основном используют не растворы нативной крови, а фотоизображения мазков крови. Это связано с тем, что окраска образца создает дополнительную контрастность объекта, выделяет особенности морфологии клеток, дает возможность разрешить клетки крови разного типа. Так, задача подсчета эритроцитов с помощью фотоизображений препаратов крови рассматривалась в [9–16]. Достигнутая точность счета эритроцитов (RBC) программным образом по отношению к «ручному» составила 96–98% в [9], 96% в [13], 92% в [14], и, заметим, что в [9, 13, 14] использовались разные подходы, алгоритмы обработки фотоизображений.

Более сложной по сравнению с идентификацией и счетом эритроцитов является задача распознавания лейкоцитов (WBC). Это обусловлено тем, что размер и форма лейкоцитов значительно более переменчивы по сравнению с эритроцитами, кроме того, лейкоциты могут оказаться соизмеримыми с эритроцитами. В этом случае прибор может воспринять эритроцит за лейкоцит – возникает ошибка в определении содержания лейкоцитов в пробе крови. Попытки идентификации и счета лейкоцитов предпринимались в [17–20]. Заметим, что точность счета клеток (лимфоцитов) в мазке в [17] составила 94% в сравнении с «ручным» методом.

Представляется принципиальным отметить два обстоятельства, возникающих при анализе мазков крови с помощью цифровой микроскопии.

1. Анализ мазков позволяет определить соотношение количеств эритроцитов, лейкоцитов



и тромбоцитов, что важно для некоторых задач лабораторной диагностики. Однако он принципиально не дает абсолютные величины концентраций этих клеток в пробе крови, так как при таком анализе препарат оказывается высушенным, отсутствует объем, в котором расположены анализируемые клетки крови.

2. Подготовка мазков требует строгого соблюдения определенной технологии, времени подготовки, опыта врача-лаборанта. К сожалению, на практике не всегда можно получить удовлетворительную повторяемость в прокраске объектов, как по всей поверхности мазка, так и от объекта к объекту исследования. Это затруднение особенно принципиально при цифровой обработке фотоизображений, когда при сегментации клеток, как правило, используются определенные пороговые условия, связанные с яркостью пиксель фотоизображения.

В этой связи представляет интерес изучение возможности идентификации и счета форменных элементов крови в ее нативном состоянии (в растворе без окраски красителем). Отметим, что количество исследований в этом направлении значительно меньше, нежели с окрашенными мазками крови. Нам известна лишь работа [21], где предпринята попытка определения концентрации эритроцитов и лейкоцитов в пробе нативной крови с использованием принципов цифровой микроскопии.

Вполне очевидно, что исследование раствора нативной крови принципиально дает возможность не только определить соотношение количеств форменных элементов разного типа, но и измерить абсолютные величины их концентраций. Этого можно достичь, если цифровое фотоизображение объекта получено в условиях, когда исследуемая проба крови помещена в счетную камеру, объем которой известен.

Проведенные нами эксперименты показывают, что такой счет эритроцитов и тромбоцитов в растворе нативной крови методом цифровой микроскопии не представляет особых трудностей [22], однако идентификация и счет лейкоцитов весьма затруднены по нескольким причинам:

- 1) отмеченная выше переменность размера и формы лейкоцита; соизмеримость в некоторых случаях лейкоцита с эритроцитом;
- 2) прозрачность лейкоцита без специальной его окраски, как это имеет место в мазках.

Цель настоящего исследования – поиск способа идентификации лейкоцитов в образце

раствора нативной крови, сравнение результатов компьютерного счета лейкоцитов с «ручным» подсчетом этих клеток.

### **1. Объект исследования, техника эксперимента**

Объектом исследования являлась цельная донорская кровь, которая разбавлялась в 400 раз физраствором. Капля раствора нативной крови, объемом 20 мкл, размещалась в камере Горяева. Цифровые фотоизображения объекта получались с помощью микроскопа БИОМЕД («ЛОМО», Россия), (увеличения объектива и окуляра  $40\times$  и  $10\times$  соответственно, поле зрения 0.2 мм) и фотокамеры Logitech-Quick Cam (Logitech, Швейцария). При этом разрешение (масштаб) фотоизображений данной оптической системой составляло 8 пкс/мкм. В больших квадратах камеры Горяева (общее число таких квадратов в камере 100) изготавливались фотоизображения пробы крови в различных областях анализируемой капли; 80 из них, в которых помимо эритроцитов и тромбоцитов присутствовали лейкоциты, были отобраны для компьютерной обработки фотографий. Это делалось в связи с малым стандартным количеством лейкоцитов по сравнению с количеством эритроцитов, а также значительным разведением пробы крови. Такой отбор фотоизображений позволял получить репрезентативную выборку в отношении лейкоцитов, достаточную для статистической ее обработки.

Оптическая система микроскопа фокусировалась на дно капли, что, казалось бы, требовало перед фотографированием объекта некоторого времени для инкубации клеток с целью их седиментации. Однако в силу того что высота зазора между площадкой камеры, на которую нанесена счетная сетка, и покровным стеклом составляет всего лишь 100 мкм, не было необходимости в большом времени инкубации клеток. Поэтому фотографирование объекта производилось примерно после первой минуты расположения камеры под объективом микроскопа. Результаты компьютерного счета форменных элементов крови сопоставлялись с результатами «ручного» счета тех же клеток анализируемого изображения. Заметим, что перед компьютерной обработкой фотоизображений разрешение ( $1600\times 1200$ ) каждой микрофотографии было уменьшено в 3 раза (до  $532\times 400$ ) с целью сокращения времени компьютерной обработки фотоизображений.





## 2. Идентификация лейкоцитов в растворе нативной крови

Для идентификации лейкоцитов в растворе нативной крови апробированы два подхода: градиентный метод идентификации клеток; оригинальный метод «высвечивания» лейкоцитов. Последовательно рассмотрим оба метода анализа клеток.

### 2.1. Градиентный метод идентификации лейкоцитов

Известно, что стандартное соотношение количеств форменных элементов разного типа RBC/ PLT/ WBC имеет следующий порядок – 720 : 44 : 1 (PLT-тромбоцит). Значительное превышение количества RBC, а также PLT, над содержанием WBC (рис. 1, *a*) приводит к трудностям при компьютерной идентификации лейкоцитов. С целью устранения этой трудности использовался принцип программной фильтрации эритроцитов и тромбоцитов на фотоизобра-

жении пробы раствора нативной крови. Первым этапом этой процедуры являлось распознавание эритроцитов. Для этого использовались две их особенности: стандартная в определенной мере форма клеток и способность эритроцитов поглощать световой поток. В совокупности это позволило на основании анализа большого количества фотоизображений выработать RBC фотошаблоны, с которыми в дальнейшем сравнивались идентифицируемые эритроциты. Если анализируемая клетка с высокой степенью корреляции совпадала хотя бы с одним из выбранных RBC фотошаблонов, то данная клетка воспринималась как эритроцит, она сегментировалась (рис. 1, *б*), а найденный сегмент, содержащий эритроцит, исключался из дальнейшего рассмотрения при поиске и идентификации других клеток. Естественно, увеличение количества отобранных RBC фотошаблонов приводит к снижению числа нераспознанных эритроцитов.

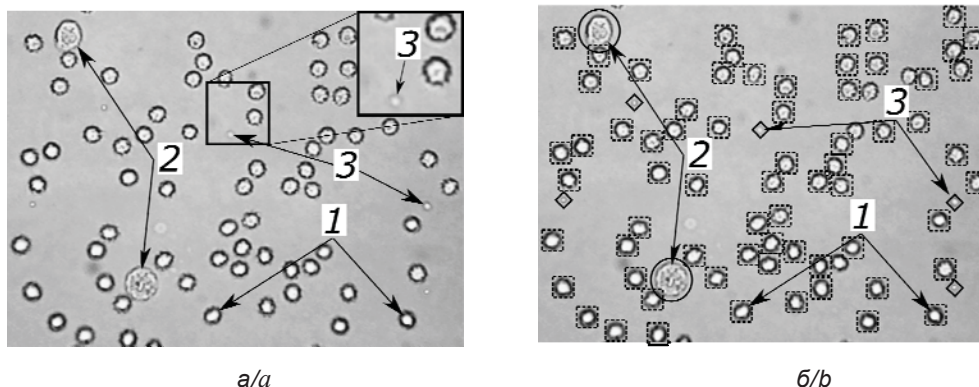


Рис. 1. Фотоизображение форменных элементов крови: *a* – экспериментально полученное фотоизображение объекта; *б* – то же изображение после сегментации эритроцитов, лейкоцитов и тромбоцитов. Обозначения: 1 – эритроциты; 2 – лейкоциты; 3 – тромбоциты (клетки размещены в квадраты, овалы и ромбы соответственно)

Fig. 1. Photoimage of blood elements: *a* – experimentally obtained photoimage of the object; *b* – the same image after segmentation of erythrocytes, white blood cells and platelets. Notations: 1 – erythrocytes; 2 – leukocytes; 3 – platelets (Cells are placed in squares, ovals and rhombs, respectively)

Процедура распознавания тромбоцитов и лейкоцитов начиналась с фильтрации тех сегментов фотоизображения, в которых на предварительном этапе были обнаружены эритроциты. Лейкоциты и тромбоциты в нативном образце крови являются практически прозрачными клетками, что затрудняет использование фотометрического подхода. Поэтому для этих клеток был использован градиентный подход обработки фотоизображения, включающий в себя распознавание границ клеток, определение их координат, сегментацию клеток

(рис. 1, *б*). Вслед за сегментацией клеток осуществлялась процедура бинаризации изображения, т.е. представление каждого пикселя изображения одним из двух цветов. Эти действия описаны в [23] для регистрации тромбоцитов и их агрегатов. Пример бинаризованных и сегментированных фотоизображений тромбоцитов и лейкоцитов после предварительной фильтрации изображений эритроцитов, а также некоторое количество нераспознанных и, следовательно, не отфильтрованных эритроцитов представлен на рис. 2.

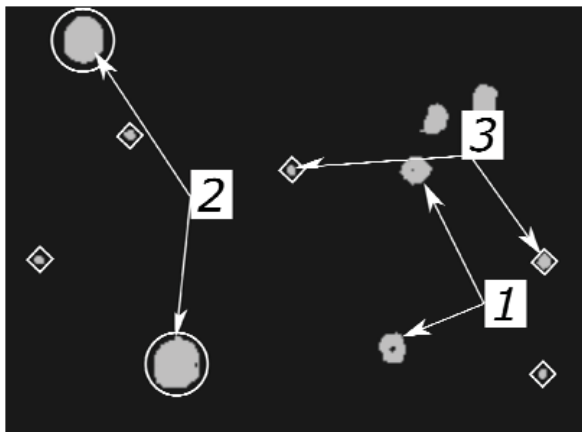


Рис. 2. Фотоизображение нераспознанных эритроцитов (1), сегментированных и бинаризованных лейкоцитов (2) и тромбоцитов (3)

Fig.2. Photograph of unrecognized erythrocytes (1), segmented and binarized leukocytes (2) and platelets (3)

Изображение на рис. 2 соответствует представленному на рис. 1, б. Использование размера клетки в качестве параметра для разрешения лейкоцита от тромбоцита затруднительно в связи со сложной формой лейкоцита. Поэтому в качестве параметра использовался не размер клетки, а площадь  $S$ , занимаемая клеткой на фотоизображении. Кроме того, попиксельный подсчет площади бинаризованного изображения клетки не представляет трудности.

После сегментации лейкоцитов и тромбоцитов, бинаризации изображения и определения величины  $S$  производилась фильтрация клеток по размерам площадей: клетки, площадь которых оказывалась ниже порогового значения  $S_{\text{пор}}$  ( $S \leq S_{\text{пор}}$ ), были отнесены к тромбоцитам.

Соответствующие сегменты фотоизображения, содержащие распознанные тромбоциты, исключались из дальнейшего анализа. За пороговую величину принималась  $S_{\text{пор}}$  соответствующая 15 пикселям для фотоизображения с разрешением  $532 \times 400$  пиксель, что было адекватно размеру тромбоцита. Клетки с  $S > S_{\text{пор}}$  относились к лейкоцитам, производился их подсчет. Подобный подход использовался и для снижения количества нераспознанных на первом этапе обработки фотоизображений эритроцитов. В результате бинаризованное фотоизображение в значительной мере содержало лишь лейкоциты, фото образца исследуемой крови оказывалось готовым к счету WBC.

## 2.2. Идентификация лейкоцитов методом их «высвечивания»

Многочисленные эксперименты по получению микрофотографий образцов раствора нативной крови позволили выявить интересный эффект: при дефокусировке оптической системы цифрового микроскопа яркость изображений лейкоцитов значительно увеличивается («высвечивание» лейкоцитов), в то время как яркость фотоизображений других форменных элементов снижается и, кроме того, происходит размытие границ фотоизображений эритроцитов и тромбоцитов (рис. 3). Под дефокусировкой оптической системы микроскопа понимаем увеличение расстояния между объективом и объектом на несколько микрометров (соизмеримо с размерами самого лейкоцита) относительно первоначального положения микроскопа, настроенного на визуализацию объекта. Этот эффект очевиден,

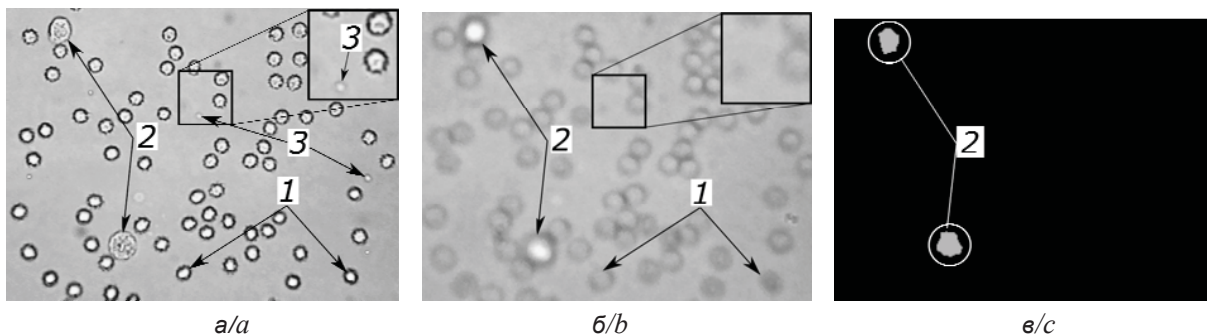


Рис. 3. Иллюстрация эффекта «высвечивания» лейкоцитов раствора нативной крови при дефокусировке оптической системы цифрового микроскопа: а – сфокусированное изображение форменных элементов крови; б – то же изображение, что и на рис. 3, а, но в случае дефокусировки цифрового микроскопа; в – бинаризованное изображение «высвеченных» лейкоцитов (обозначения см. рис.1, а)

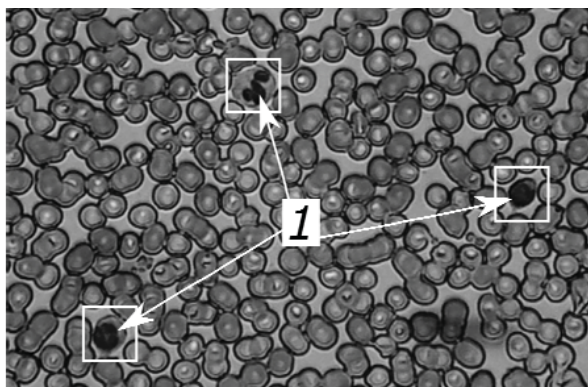
Fig. 3. The demonstration of the effect of «highlighting» of leukocytes in native blood solution when optical system of digital microscope was defocused: а – focused image of blood elements; б – the same image as in Fig. 3,а, but in the case when digital microscope was defocused; в – a binarized image of the «highlighted» leukocytes (Notations are as in Fig.1, а)



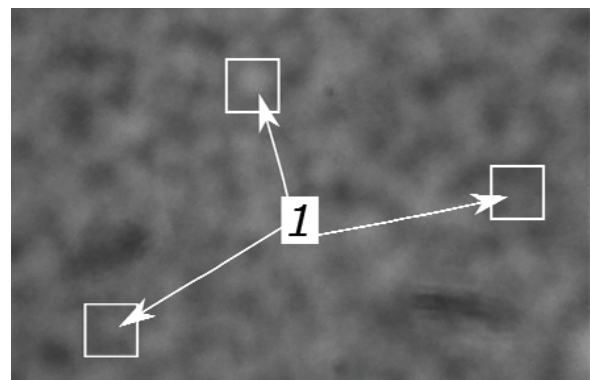
если сопоставить рис. 3, а и 3, б. Заметим, что в силу дефокусировки цифрового микроскопа на рис. 3, в в отличие от рис. 2 отсутствуют тромбоциты и нераспознанные эритроциты, в то время как изображение лейкоцитов усилено («высвечено»). Это дает основание к упрощению алгоритма обработки фотоизображений объекта – отпадает необходимость последовательной идентификации и сегментации RBC и PLT, бинаризации фотоизображения и последующей фильтрации изображений эритроцитов и тромбоцитов. Последнее легко видеть на рис. 3, в – отсутствует сегментация эритроцитов и тромбоцитов в отличие от фотоизображения на рис. 1, б. Обработка фотоизображения образца сводится к выделению «высвеченных» лейкоцитов и подсчету их числа. Кроме того, в силу WBC «высвечивания» повышается градиент яркости пиксель вблизи границы лейкоцита, что увеличивает точность распознавания лейкоцита на фоне «размытых» изображений других форменных элементов крови.

### 2.3. Механизм высвечивания лейкоцитов в растворе нативной крови

Возможной причиной обнаруженного эффекта является существенное отличие формы и размера лейкоцитов от тех же параметров для тромбоцитов и эритроцитов. Можно предположить, что лейкоцит в сочетании с микроскопом работает как дополнительная микролинза. Следует отметить, что: 1) обнаруженный эффект наблюдался уверенно во всех случаях присутствия лейкоцитов в растворе нативной крови; 2) эффект «высвечивания» лейкоцитов отсутствовал при наблюдении лейкоцитов в мазке крови. Последнее демонстрируется на рис. 4, где зоны, содержащие лейкоциты, выделены квадратами. Однако эти клетки, отчетливо видимые на рис. 4, а, не только не «высвечиваются», но и становятся невидимыми при дефокусировке микроскопа (рис. 4, б). Объяснение: в мазке форменные элементы находятся в высушенном состоянии, поэтому лейкоцит не может рассматриваться как объемное тело – микролинза.



а/а



б/б

Рис. 4. Изображение форменных элементов пробы крови в мазке: 1 – лейкоциты; а – сфокусированное изображение; б – дефокусированное изображение

Fig. 4. Image of formed elements of the blood sample in the smear: 1 – white blood cells; а – the focused image; б – the defocused one

На рис. 5 приведены зависимости яркости  $B$  пикселей фотоизображений эритроцитов и лейкоцитов в растворе нативной крови, а также лейкоцитов в мазке крови от величины смещения объектива  $L$  относительно его исходного положения. Заметим, что яркость  $B$  для лейкоцита определялась путем усреднения величин яркости пикселей, расположенных в центре клетки в заданной зоне, – квадрат со стороной 20 пикселей. Аналогично рассчитывалась яркость для эритроцитов с той лишь разницей, что в этом случае проводилось дополнительное усреднение

по множеству эритроцитов. Из рис. 5 видно, что 1) в случае раствора нативной крови (кривая 1) имеется пик яркости  $B$  для лейкоцитов в точке  $L=30$  мкм; однако подобный пик для эритроцитов (кривая 2) не наблюдается, практически для RBC зависимость  $B(L)$  отсутствует; 2) зависимость  $B(L)$  отсутствует и для лейкоцитов в мазке крови (кривая 3); 3) яркость  $B$  в максимуме (кривая 1) превышает уровень яркости для RBC (кривая 2) примерно в 2 раза, что можно использовать для распознавания лейкоцитов в растворе нативной крови.

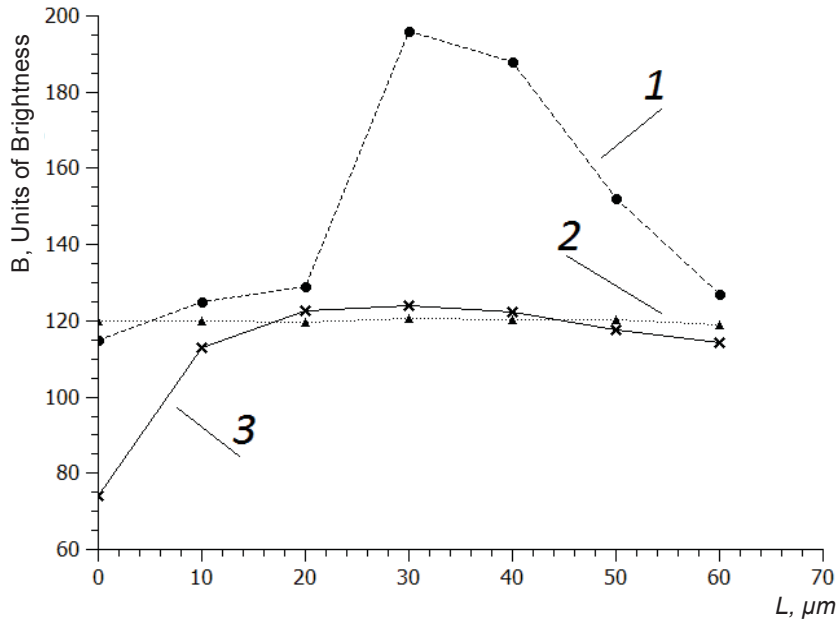


Рис. 5. Зависимости яркости пикселей фотоизображений  $B$  от величины смещения объектива микроскопа  $L$  относительно его исходного положения: 1, 2 – лейкоцит и эритроцит раствора нативной крови соответственно; 3 – лейкоцит в мазке крови  
Fig. 5. The dependence of brightness  $B$  of pixels of the photo image on the amount of microscope lens shift  $L$  with the respect to its initial position: 1, 2 – leukocyte and erythrocyte of native blood solution; 3 – white blood cell in a blood smear

Заметим, что измерения, подобные приведенным на рис. 5, проводились многократно (30 различных лейкоцитов). Во всех случаях устойчиво наблюдался эффект их «высвечивания»: среднее значение яркости  $B$  по всем анализируемым лейкоцитам составило  $\sim 197$  ед. при стандартном отклонении  $\sigma B \sim \pm 12$  ед.

С целью подтверждения линзового эффекта, лежащего в основе наблюдаемого явления

«высвечивания» лейкоцитов, был предпринят модельный опыт. На стеклянную подложку наносилась капля глицерина диаметром менее миллиметра (ее можно трактовать как микролинзу) и изготавливались ее фотоизображения при разных смещениях  $L$  (рис. 6).

Для изготовления фото с каплей глицерина использовались окуляр  $10\times$  и объектив  $10\times$ . При этом величина поля зрения и пространственное

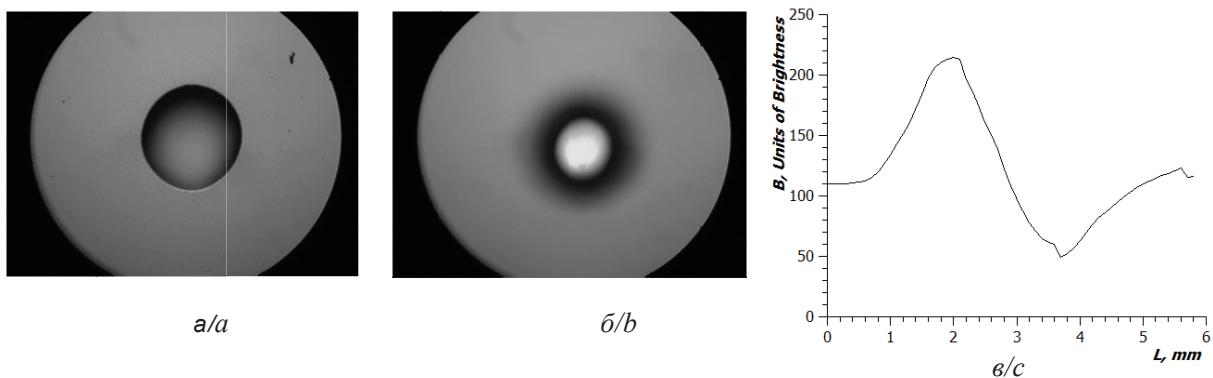


Рис. 6. Фотоизображение микролинзы (капли глицерина) и зависимость яркости  $B$  ее свечения от величины смещения объектива микроскопа  $L$ : а – сфокусированное изображение, б – дефокусированное изображение; в – зависимость яркости  $B$  свечения микро линзы от смещения объектива микроскопа  $L$

Fig. 6. Photo image of the microlens (drop of glycerin) and the dependence of its brightness  $B$  on the value of microscope lens shift  $L$ : a – the focused image, b – the defocused image; c – the dependence of microlens brightness  $B$  on the value of microscope lens shift  $L$





разрешение (масштаб) составляли 0.8 мм и 1.7 пкс/мкм соответственно, а диаметр капли – 260 мкм. Фотоизображение микролинзы на рис. 6, б подобно изображению «высвеченного» лейкоцита на рис. 3, б. Для микролинзы по аналогии с лейкоцитом снималась зависимость  $B(L)$  (рис. 6, в). Полученный график  $I$  напоминает кривую  $I$  на рис. 5, отличие можно объяснить тем, что экспериментально доступный шаг при получении последней был лишь 10 мкм – недостаточно полное число экспериментальных точек. В целом результаты, проиллюстрированные на рис. 4, 5, 6, свидетельствуют о том, что в основе обнаруженного явления – «высвечивания» лейкоцитов лежит линзовый эффект, когда исследуемый лейкоцит можно рассматривать как оптическую линзу.

### 3. Результаты счета лейкоцитов и их обсуждение

Как отмечалось выше, 80 фотоизображений раствора нативной крови были отобраны для их компьютерной обработки, при этом общее количество подсчитанных клеток составило 4560. При этом количество эритроцитов – 4184, тромбоцитов – 292. После их сегментации и фильтрации число лейкоцитов, подсчитанных «ручным» образом, составило 84, т.е. практически по одному лейкоциту на изображении. Результаты компьютерного счета клеток сопоставлялись с результатами «ручного» счета той же пробы непосредственно с экрана монитора ПК. Так как фотоизображения пробы крови изготавливались в условиях, когда исследуемая кровь располагалась в камере Горяева, то оказывалось возможным определить концентрацию лейкоцитов в пробе. Она оказалась равной:  $C_{\text{ручн}} = 102 \cdot 10^9 \text{ (л}^{-1}\text{)}$  для ручного счета и  $C_{\text{комп}} = 100 \cdot 10^9 \text{ (л}^{-1}\text{)}$  для компьютерного. Заметим, что в норме для взрослых людей концентрация лейкоцитов составляет величину порядка  $C_{\text{норма}} = (4 - 10) \cdot 10^9 \text{ (л}^{-1}\text{)}$  с небольшим отклонением для мужчин и женщин. Сравнение результатов счета лейкоцитов со стандартным значением концентрации лейкоцитов  $C_{\text{норма}}$  показывает, что полученные результаты завышены примерно в 14 раз, что объяснимо специальным отбором именно тех фотоизображений, на которых непременно имелись изображения лейкоцитов. Стоит отметить, что совпадение компьютерного счета лейкоцитов с «ручным» составляет  $(C_{\text{комп}}/C_{\text{ручн}}) \cdot 100\% = 98\%$ , что не уступает и даже превосходит результаты иных подобных работ

[17–20]. Следует отметить, что полученные результаты компьютерного счета лейкоцитов были достигнуты путем применения эффекта их «высвечивания». Дело в том, что использование обнаруженного эффекта «высвечивания» лейкоцитов позволило существенно понизить ошибку в определении их концентрации в рамках цифровой микроскопии. Действительно, применение «высвечивания» лейкоцитов понизило величину отклонения компьютерного счета WBCs по сравнению с «ручным» с 27 до 2.0%. Последнее, вероятно, связано с тем, что некоторые достаточно крупные или близко расположенные друг к другу эритроциты, нераспознанные на этапе их идентификации, воспринимались по площадям как лейкоциты. Обработка дефокусированного изображения позволяет снизить такую ошибку. Заметим, что повышение точности распознавания лейкоцитов можно использовать для последующего уточнения числа эритроцитов.

### Заключение

Предложены два алгоритма обработки фотоизображений раствора проб крови в нативном ее состоянии с целью идентификации и счета лейкоцитов. Обнаружено явление «высвечивания» лейкоцитов при дефокусировке цифрового микроскопа; показано, что это явление отсутствует при наблюдении эритроцитов и тромбоцитов. Экспериментальное моделирование этого явления показало, что в его основе лежит «линзовый» эффект – лейкоцит нативной крови подобен микролинзе. Предложено использовать обнаруженный эффект для распознавания лейкоцитов на фоне множества эритроцитов и тромбоцитов. Применение эффекта «высвечивания» лейкоцитов значительно повысило процент совпадения результатов компьютерного счета лейкоцитов в пробе по отношению к «ручному». Показано, что точность счета лейкоцитов крови в ее нативной форме может быть соизмеримой или превосходить точность аналогичных исследований в мазке. Предложенный анализ нативной крови значительно упрощает пробоподготовку по сравнению с мазком и, кроме того, принципиально позволяет перейти от выявления соотношения форменных элементов крови к определению их концентраций в образце.

*Авторы поздравляют Приезжева Александра Васильевича с юбилеем, выражают признательность за более чем 30-летние научные контакты, полезные советы и интерес к проводимым ими исследованиям.*



## Список литературы

1. *Steinkamp J. A.* Flow cytometry // *Rev. Sci. Instrum.* 1984. Vol. 55, № 9. P. 1375–1400.
2. *Tuchin V. V., Galanzha E. I., Zharov V. P.* *In vivo* Image Flow Cytometry // *Advanced Optical Flow Cytometry: Methods and Disease Diagnoses*, First Edition. Ed. by Valery V. Tuchin. 2011 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Published 2011 by Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. 387–431. DOI: 10.1002/9783527634286.ch14.
3. *Orfao A., Ruiz-Arguelles A., Lacombe F., Ault K., Basso G., Danova M.* Flow cytometry : its applications in hematology // *Haematologica*. 1995. Vol. 80, iss. 2. P. 69–81.
4. *Canellini G., Rubin O., Delobel J., Cretaz D., Lion N., Tissot J.* Red blood cell microparticles and blood group antigens : an analysis by flow cytometry // *Blood Transfus.* 2012. Vol. 10. P. 39–45.
5. *Uyas G. N.* Simultaneous human AB0 and RH(D) blood typing or antibody screening by flow cytometry. US Patent № 5776711, published on July 7, 1998.
6. *Tatsumi N., Tsuda I., Inoue K.* Trial AB0 and Rh blood typing with an automated blood cell counter // *Clin. Lab. Haematol.* 1989. Vol. 11, iss. 2. P. 123–130.
7. *Дубровский В. А., Дворецкий К. Н., Щербак И. В., Балаев А. Э., Киричук В. Ф.* Лазерное пространственное сканирование в проточной цитометрии // *Цитология*. 1999. Т. 41, № 1. С. 104–108.
8. *Doubrovski V. A., Gnilova Yu. A., Zabenkov I. V.* R and G color components competition of RGB image decomposition as a criterion to register RBC agglutinates for blood group typing // *J. Biomed. Opt.*, 2014, Vol. 19, iss. 3. DOI: 10.1117/1.JBO.19.3.036012.
9. *Дырняев А. В.* Способ подсчета эритроцитов на изображениях мазков крови: пат. 2488821 МПК G01N 33.48 / заявитель и патентообладатель Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «С.-Петербург. гос. нац. исслед. ун-т информационных технологий, механики и оптики» – 201152334/15; заявл. 21.12.2011; опубл. 27.07.2013, Бюл. № 21.
10. *Дырняев А. В.* Метод подсчета эритроцитов на изображениях мазков крови // *Науч.-техн. вестн. С.-Петерб. гос. ун-та информационных технологий, механики и оптики*. 2011. Т. 76, № 6. С. 18–23.
11. *Дырняев А. В., Попанов А. С.* Комбинированный подсчет эритроцитов на изображениях мазков крови // *Науч.-техн. вестн. С.-Петерб. гос. ун-та информационных технологий, механики и оптики*. 2012. Т. 77, № 1. С. 20–24.
12. *Maitra M., Gupta R.K., Mukherjee M.* Detection and Counting of Red Blood Cells in blood cell Images using hough transform // *Intern. J. of Computer Applications*. 2012. Vol. 53, iss. 16. P. 18–22.
13. *Nasrul Humaimi Mahmood, Muhammad Asraf Mansor.* Red blood cells estimation using Hough transform technique // *Signal & Image Processing : An International Journal (SIPIJ)*, 2012. Vol. 3, iss. 2. P. 53–62.
14. *Siti Madidah Mazalan, Nasrul Humaimi Mahmood, Mohd Azhar Abdul Razak.* Automated Red Blood Cells Counting in Peripheral Blood Smear Image Using Circular Hough Transform // *First International Conference on Artificial Intelligence, Modelling & Simulation*. Biosciences and Medical Engineering Universiti Teknologi Malaysia Johor, Malaysia, 2013. P. 320–324. DOI: 10.1109/AIMS.2013.59.
15. *Mahmood N. H., Mansor M. A.* Red blood cells estimation using Hough transform technique // *Signal & Image Processing : An International Journal (SIPIJ)*. 2012. Vol. 3, iss. 2. P. 53–64. DOI: 10.5121/sipij.2012.3204.
16. *Pandit A., Kolhar S., Patil P.* Survey on Automatic RBC Detection and Counting // *Intern. J. of Advanced Research in Electrical, Electronics and Instrumentation Engineering*. 2015. Vol. 4, iss. 1. P. 128–131. DOI: 10.15662/ijareeie.2015.0401012.
17. *Alilou M., Kovalev V.* Automatic object detection and segmentation of the histocytology images using reshaping agents // *Image Anal Stereol.* 2013. Vol. 32. P. 89–99. DOI: 10.5566/ias.V32.
18. *Cuevas E., Diaz M., Manzanares M., Zaldivar D., Perez M.* An improved computer vision method for detecting white blood cells // *Computational and Mathematical Methods in Medicine*. 2013. art. № 137392. P. 1–19. DOI: 10.1155/2013/137392.
19. *Hiremath P. S., Bannigidad P., Geeta S.* Automated Identification and Classification of White Blood Cells (Leukocytes) in Digital Microscopic Images // *IJCA Special Issue on “Recent Trends in Image Processing and Pattern Recognition” RTIPPER*, 2010. P. 59–63.
20. *Соснин Д. Ю., Фалков Б. Ф., Ненашева О. Ю.* Оценка правильности распознавания клеток системой автоматизированного анализа крови Vision He // *Уральск. мед. журн.* 2012. № 13. С. 1–7.
21. *Patil P. R., Sable G. S., Anandgaonkar G.* Counting of WBCs and RBCs from blood images using gray thresholding // *Intern. J. of Research in Engineering and Technology*. 2014. Vol. 3, iss. 4. P. 391–395.
22. *Torbin S. O., Doubrovski V. A., Zabenkov I. V., Tsareva O. E.* The counting of native blood cells by digital microscopy // *Saratov Fall Meeting 2016 : Optical Technologies in Biophysics and Medicine XVIII* / ed. by Elina A. Genina, Valery V. Tuchin, Proc. of SPIE Vol. 10336, 103360A (9 p.). DOI: 10.1117/12.2268575.
23. *Дубровский В. А., Зabenkov И. В., Торбин С. О., Еремин В. И., Царева О. Е.* Определение геометрических размеров тромбоцитарных агрегатов *in vitro* методом цифровой микроскопии // *Мед. техника*. 2013. № 3. С. 10–13.

## Образец для цитирования:

Дубровский В. А., Торбин С. О. Эффект «высвечивания» лейкоцитов и его применение для идентификации клеток крови методом цифровой микроскопии // *Изв. Сарат. ун-та. Нов. сер. Сер. Физика*. 2017. Т. 17, вып. 3. С. 191–200. DOI: 10.18500/1817-3020-2017-17-3-191-200.



## Leukocytes' «Highlighting» Effect and its Application to Identify Blood Cells by Digital Microscopy Method

V. A. Doubrovski, S. O. Torbin

Valeri A. Doubrovski, ORCID 0000-0003-2423-6504, Saratov State Medical University named after V. I. Razumovsky, 112, B. Kazach'ya Str., Saratov, 410012, Russia, doubrovski43@yandex.ru

Stanislav O. Torbin, ORCID 0000-0003-2645-306X, Saratov State Medical University named after V. I. Razumovsky, 112, B. Kazach'ya Str., Saratov, 410012, Russia, stanislav.torbin@yandex.ru

**Objective:** To find a way of identifying and counting of leukocytes in a native blood sample. **Materials and equipments:** Whole donor blood sample, digital microscope. **Methods and approaches:** The development of a method of leukocytes' identification and counting for native blood samples was carried out on the basis of digital microscopy method. **Main results:** Leukocytes' "highlighting" effect in a native blood sample was revealed experimentally by digital microscope examining. The effect is that when a microscope lens, initially focused on the object, is removed away from the leukocyte, its image becomes transformed and cell's image brightness increases. At the same time, this phenomenon is not observed in respect to erythrocytes and platelets, what makes it possible to distinguish leukocyte from other types of blood cells during their counting. The effect revealed experimentally is not observed on any type of blood cells including leucocytes for the case of smears. It has been shown experimentally that the effect observed is based on the "lens" mechanism. Statistical studies were carried out on a variety of native blood cells. It is shown that the application of leukocytes' "highlighting" effect gives a significant increase in the accuracy of counting of these type of cells when native blood formula is under analysis by digital microscopy method.

**Key words:** blood cells, leukocytes, cell counting, digital microscopy.

### References

1. Steinkamp J. A. Flow cytometry. *Rev. Sci. Instrum.*, 1984, vol. 55, no. 9, pp. 1375–1400.
2. Tuchin V. V., Galanzha E. I., Zharov V. P. *In vivo* Image Flow Cytometry. In: *Advanced Optical Flow Cytometry: Methods and Disease Diagnoses*, First Edition. Ed. by Valery V. Tuchin. 2011 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Published 2011 by Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. 387-431. DOI: 10.1002/9783527634286.ch14
3. Orfao A., Ruiz-Arguelles A., Lacombe F., Ault K., Basso G., Danova M. Flow cytometry: its applications in hematology. *Haematologica*, 1995, vol. 80, iss. 2, pp. 69–81.
4. Canellini G., Rubin O., Delobel J., Crettaz D., Lion N., Tissot J. Red blood cell microparticles and blood group antigens: an analysis by flow cytometry. *Blood Transfus.*, 2012, vol. 10, pp. 39–45.
5. Vyas G. N. *Simultaneous human AB0 and RH(D) blood typing or antibody screening by flow cytometry*. US Patent, no. 5776711, published on July 7, 1998.
6. Tatsumi N., Tsuda I., Inoue K. Trial AB0 and Rh blood typing with an automated blood cell counter. *Clin. Lab. Haematol.*, 1989, vol. 11, iss. 2, pp. 123–130.
7. Doubrovski V. A., Dvoretzki K. N., Shchebakova I. V., Balaev A. E., Kirichuk V. F. Lazernoe prostranstvennoe skanirovanie v protochnoj citometrii [Laser space scanning in flow cytometry]. *Cytology*, 1999, vol. 41, iss. 1, pp. 104–108 (in Russian).
8. Doubrovski V. A., Ganilova Yu. A., Zabenkov I. V. R and G color components competition of RGB image decomposition as a criterion to register RBC agglutinates for blood group typing. *J. Biomed. Opt.*, 2014, vol. 19, iss. 3. DOI: 10.1117/1.JBO.19.3.036012.
9. Dyrnaev A. V. *Sposob podscheta ehritroцитов na izobrazheniyah mazkov krovi* [Method of counting red blood cells on images of blood smears] *Pat. 2488821 MPK G01N 33.48; zayavitel' i patentoobladatel' Federal'noe gosudarstvennoe byudzhethnoe obrazovatel'noe uchrezhdenie vysshego professional'nogo obrazovaniya "Sankt-Peterburgskij nacional'nyj issledovatel'skij universitet informacionnyh tekhnologij, mekhaniki i optiki"* – 2011152334/15, zayavl. 21.12.2011, opubl. 27.07.2013, Byul. № 21.
10. Dyrnaev A. V. Metod podscheta ehritroцитов na izobrazheniyah mazkov krovi [The method of erythrocytes counting for the blood smear images]. *Scientific and Technical Herald of St. Petersburg State University of Information Technologies, Mechanics and Optics*, 2011, vol. 76, iss. 6, pp. 18–23 (in Russian).
11. Dyrnaev A. V., Potapov A. S. The combined red blood cells' counting in the images of blood smears. *Scientific and Technical Herald of St. Petersburg State University of Information Technologies, Mechanics and Optics*, 2012, vol. 77, iss. 1, pp. 20–24.
12. Maitra M., Gupta R. K., Mukherjee M. Detection and Counting of Red Blood Cells in blood cell Images using hough transform. *International Journal of Computer Applications*, 2012, vol. 53, iss. 16, pp. 18–22.
13. Nasrul Humaimi Mahmood, Muhammad Asraf Mansor. Red blood cells estimation using Hough transform technique, *Signal & Image Processing: An International Journal (SIPIJ)*, 2012, vol. 3, iss. 2, pp. 53–62.
14. Siti Madihah Mazalan, Nasrul Humaimi Mahmood. Mohd Azhar Abdul Razak. Automated Red Blood Cells Counting in Peripheral Blood Smear Image Using Circular Hough Transform. In: *First International Conference on Artificial Intelligence, Modelling & Simulation*. Biosciences and Medical Engineering Universiti Teknologi Malaysia Johor, Malaysia, 2013, pp. 320–324. DOI: 10.1109/AIMS.2013.59.
15. Mahmood N. H., Mansor M. A. Red blood cells estimation using Hough transform technique. *Signal & Image Processing: An International Journal (SIPIJ)*, 2012, vol. 3, iss. 2, pp. 53–64. DOI: 10.5121/sipij.2012.3204.
16. Pandit A., Kolhar S., Patil P., Survey on Automatic RBC Detection and Counting. *International Journal of Advanced Research in Electrical, Electronics and Instrumentation Engineering*, 2015, vol. 4, iss. 1, pp. 128–131. DOI: 10.15662/ijareeie.2015.0401012.



17. Alilou M., Kovalev V. Automatic object detection and segmentation of the histocytology images using reshaping agents. *Image Anal Stereol*, 2013. Vol. 32, pp. 89–99. DOI: 10.5566/ias.V.32.
18. Cuevas E., Diaz M., Manzanares M., Zaldivar D., Perez M. An improved computer vision method for detecting white blood cells. *Computational and Mathematical Methods in Medicine*, 2013, art. no. 137392, pp. 1–19. DOI: 10.1155/2013/137392.
19. Hiremath P. S., Bannigidad P., Geeta S. Automated Identification and Classification of White Blood Cells (Leukocytes) in Digital Microscopic Images. *IJCA Special Issue on "Recent Trends in Image Processing and Pattern Recognition" RTIPPER*, 2010, pp. 59–63.
20. Sosnin D. Yu., Falkov B. F., Nenasheva O. Yu. Ocenka pravil'nosti raspoznavaniya kletok sistemoj avtomatizirovannogo analiza krovi [The estimation of the correctness of cells identification by the automated blood cells counting system Vision He]. *Ural Med. J.*, 2012, no. 13, pp. 1–7 (in Russian).
21. Patil P. R., Sable G. S., Anandgaonkar G. Counting of WBCs and RBCs from blood images using gray thresholding. *International Journal of Research in Engineering and Technology*, 2014, vol. 3, iss. 4, pp. 391–395.
22. Torbin S. O., Doubrovski V. A., Zabenkov I. V., Tsareva O. E. The counting of native blood cells by digital microscopy. *Saratov Fall Meeting 2016: Optical Technologies in Biophysics and Medicine XVIII*. Ed. by Elina A. Genina, Valery V. Tuchin, Proc. of SPIE Vol. 10336, 103360A (9 pp.). DOI: 10.1117/12.2268575.
23. Doubrovski V. A., Zabenkov I. V., Torbin S. O., Eremin V. I., Tsareva O. E. Determination of Platelet Aggregate Size *in vitro* Using Digital Microscopy. *Bio-medical Engineering*, 2013, vol. 3, pp. 10–13.

---

**Cite this article as:**

Doubrovski V. A., Torbin S. O. Leukocytes' «Highlighting» Effect and its Application to Identify Blood Cells by Digital Microscopy Method. *Izv. Saratov Univ. (N.S.), Ser. Physics*, 2017, vol. 17, iss. 3, pp. 191–200 (in Russian). DOI: 10.18500/1817-3020-2017-17-3-191-200.

---





## ИЗ ИСТОРИИ ФИЗИКИ

УДК 001.8

### ПЕРВАЯ НОБЕЛЕВСКАЯ (К 60-ЛЕТИЮ ПРИСУЖДЕНИЯ НОБЕЛЕВСКОЙ ПРЕМИИ АКАДЕМИКУ Н. Н. СЕМЁНОВУ)

В. М. Аникин

Аникин Валерий Михайлович, доктор физико-математических наук, профессор, декан, заведующий кафедрой компьютерной физики и метаматериалов на базе Саратовского филиала Института радиотехники и электроники имени В. А. Котельникова РАН, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, anikinvm@info.sgu.ru

Статья посвящена 60-летию юбилею получения великим российским учёным Николаем Николаевичем Семёновым Нобелевской премии в области химии. Рассмотрены этапы жизненного пути Н. Н. Семёнова к высшему международному научному отличию и характерные черты его личности: раннее увлечение наукой, блестящие успехи, редкая интуиция в постановке актуальных научных задач, замечательный «нобелевский» эксперимент, первоначально оспоренный квалифицированным оппонентом, глубокое теоретическое осмысление проведенных экспериментальных исследований, открытие нового механизма воспламенения и взрыва, включая атомный взрыв, создание научного фундамента для новой отрасли науки – химической физики, отстаивание новой теории и личного достоинства. Подробно рассказывается также о нобелевских торжествах 1956 г. в Стокгольме.



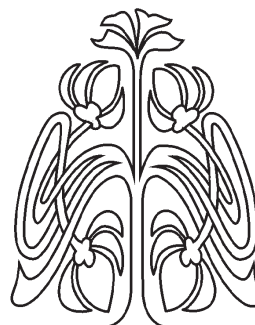
Николай Николаевич Семёнов  
(фото М. С. Наппельбаума, 1950-е гг.)

**Ключевые слова:** академик Николай Николаевич Семёнов, Нобелевская премия.

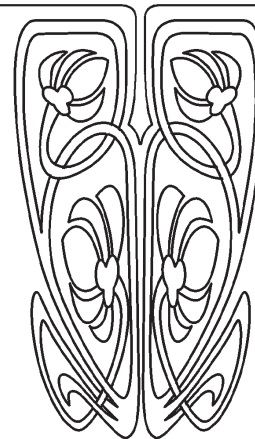
DOI: 10.18500/1817-3020-2017-17-3-201-211

Шестьдесят лет назад, 1 ноября 1956 года, произошло историческое для отечественной науки событие – академику Николаю Николаевичу Семёнову решением Шведской академии наук была присуждена Нобелевская премия по химии за исследования механизма химических реакций – открытие разветвленных цепных реакций и создание их теории. Это была первая главная международная

Приложения



ПРИЛОЖЕНИЯ





научная премия, полученная в нашей стране после 1917 г., первая и остающаяся единственной до сего времени Нобелевская премия в области химии, присужденная российскому учёному. Ранее обладателями Нобелевской премии (по физиологии и медицине) в России становились И. П. Павлов (1904) и И. И. Мечников (1908). Попутно заметим, что в 1903 г. в качестве номинанта на Нобелевскую премию выдвигался будущий первый ректор Саратовского университета В. И. Разумовский.

### «Странная» реакция окисления

А началось все с экспериментов по окислению фосфора, которые Николай Николаевич поручил провести своему молодому сотруднику Ю. Б. Харитону и аспирантке З. Ф. Вальта в Физико-техническом институте, созданном в Ленинграде А. Ф. Иоффе (будучи студентом Петербургского университета, Семёнов со второго курса занимался научной работой под руководством Абрама Федоровича с публикацией научных статей).

Можно задаться, конечно, вопросом: а почему именно такую задачу поставил Семёнов? Ответ относительно пары выбранных веществ: взаимодействие паров фосфора и кислорода можно легко наблюдать визуально, поскольку реакция (если она идет!) сопровождается световыми вспышками. В более общем и глубоком контексте речь шла о реакциях между веществами, способными к воспламенению и взрыву. Семёнов был научным гением, который одновременно обладал поразительной быстротой проникновения в научные проблемы, потрясающими организаторскими способностями и необыкновенной интуицией. Интуицию Н. Н. Семёнова будущий трижды Герой Социалистического Труда, академик, создатель советской атомной бомбы Юлий Борисович Харитон называл не иначе как «дьявольской» [1, с. 33]<sup>1</sup>.

Но вернемся к эксперименту с фосфором. Ю. Б. Харитон и З. Ф. Вальта тщательно провели наблюдения и обнаружили неожиданный факт полного прекращения быстрой реакции при понижении давления кислорода до некоторой определенной величины. Полученные результаты они не смогли объяснить с позиции существовавших в то время воззрений на кинетику химических реакций, но все же опубликовали статью «Окисление паров фосфора при малых давлениях» по

<sup>1</sup> Еще два ученика-сотрудника Н. Н. Семёнова за участие в атомном проекте стали трижды Героями Социалистического Труда – И. В. Курчатова и Я. Б. Зельдовича.

материалам своих опытов в немецком научном журнале «Zeitschrift für Physik» за 1926 г.

### Открытие цепных разветвленных реакций как механизма воспламенения и взрывов

В том же 1926 г. Ю. Б. Харитон «по протекции» П. Л. Капицы, близкого друга Н. Н. Семёнова и будущего обладателя Нобелевской премии по физике 1978 г.<sup>2</sup>, уехал на два года на стажировку в Англию к Э. Резерфорду (Нобелевская премия 1908 г.) и будущему нобелевскому лауреату 1935 г. Дж. Чедвику. В Кембридже Ю. Б. Харитон обнаружил статью признанного авторитета в области химической кинетики М. Боденштейна с критикой методики проделанного в Ленинграде эксперимента. Н. Н. Семёнов немедленно отреагировал на эту критику, поскольку она задевала честь научных исследований, проводившихся в Физико-техническом институте. Он вспоминал [2, с. 527]:

*«Я сам занялся экспериментальной проверкой, тщательно устранив указанные М. Боденштейном возможные причины ошибки. Оказалось, что ранее замеченное нами явление существует реально и еще более ярко выражено. Расширение опытов в разных условиях показало, что отмеченные критические явления имеют не только в отношении давления, но и размера сосуда, концентрации реагирующих газов, наличия примесей и др.*

*Мы получили экспериментальные закономерности, связывающие перечисленные параметры в единую формулу.*

*И тут стала ясной сама причина явлений, которая явилась основой для обнаружения большого нового класса так называемых цепных разветвленных реакций <...>. Результаты моей работы были опубликованы в 1927 году. Почти тотчас же я получил письмо от Боденштейна, где он снимал свои возражения и признал наше открытие, а вскоре на съезде электрохимиков сделал это публично. Я очень благодарен профессору Боденштейну за его критику, без которой мы вряд ли продолжили эту работу, определившую во многом направление моей научной деятельности.*

<sup>2</sup> В 1922 г. Н. Н. Семёнов и П. Л. Капица провели эксперимент по определению атомных магнитных моментов. Их работа предвосхитила опыты немецких физиков О. Штерна и В. Герлаха, за которые эмигрировавший в США Штерн в 1943 г. получил Нобелевскую премию. Художник Б. М. Кустодиев в 1921 г. написал парный портрет молодых российских учёных, веривших в своё блестящее научное будущее.



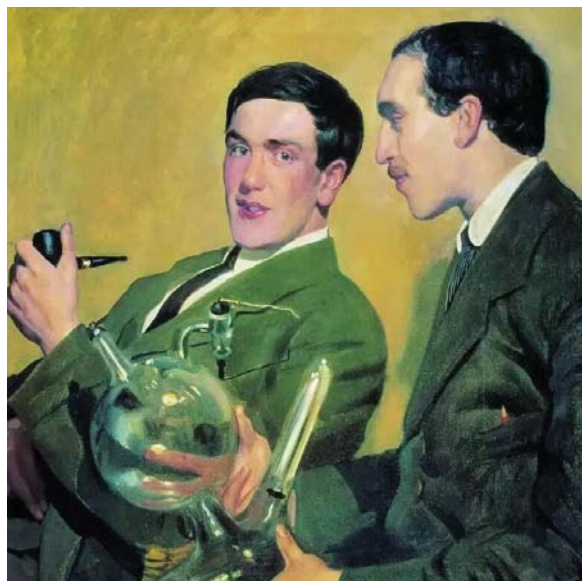
*В приведенном мной примере видна про-  
ницательность крупного ученого, признанного  
авторитета в данной области и имевшего  
определенные точки зрения, который, получив  
веские доказательства, начал пропагандировать  
результаты молодых и совсем еще неизвестных  
ученых вопреки своему прежнему мнению».*

Годом позже данные о существовании кри-  
тических параметров для некоторых химических  
реакций были получены в Оксфорде профес-  
сором Сирилом Норманом Хиншелвудом для  
иных веществ, а затем, как это обычно бывает  
в случае рождения новой научной идеи, после-  
довал вал исследований по цепным реакциям.  
Ю. Б. Харитон об этом периоде работы лабора-  
тории Семёнова писал так (сотрудники между  
собой звали его Н. Н.):

*«... У Н. Н. фантазия работала с редкой  
интенсивностью и ему приходили в голову все  
новые и новые идеи постановки опытов. По мере  
развития исследований на разных веществах, по  
мере получения разных типов реакций возникали  
новые удивительные вещи. Так, сначала был от-  
крыт нижний предел окисления, выяснилось, что  
если окислителя очень много, то реакция прекра-  
щается. Потом Н. Н. перешел на исследования  
в широком интервале температур. Процессы  
окисления газа проходили в большинстве случаев  
по типу разветвленных цепных реакций. В диа-  
пазоне разных давлений и разных температур с  
учетом влияния различных добавок это приво-  
дило к открытию новых все более и более ин-  
тересных явлений. Было наблюде-  
но невероятное разнообразие типов газовых реакций» [1, с. 35].*

Чтобы систематизировать результаты иссле-  
дований, неутомимый Н. Н. Семёнов (по выра-  
жению Ю. Б. Харитона, «он работал совершенно  
зверски» [3, с. 437]) по ночам (днем у него была  
масса организационных дел) засел за написание  
книги «Цепные реакции» [4], которая была из-  
дана в Госхимиздате в 1934 г. и вскоре в расши-  
ренном варианте переведена на английский язык  
(в переводе Семёнову помогал Я. И. Френкель,  
его друг с еще студенческих времен). В книге  
Семёнов сделал вывод о том, что «цепная теория  
качественно, а нередко количественно позволяет  
объяснить и предвидеть поведение весьма раз-  
нообразных реакций» [4, с. 549].

На экземпляре книги, подаренном Ю. Б. Хари-  
тону, Николай Николаевич оставил такую надпись:  
«Дорогому Юлию Борисовичу, который первый  
толкнул мою мысль в область цепных реакций»  
[3, с. 437].



Б. М. Кустодиев  
Портрет П. Л. Капицы и Н. Н. Семёнова, 1921 г.

### Кого считать научно одаренным

Свой труд Н. Н. Семёнов посвятил швед-  
скому химику С. Аррениусу и голландскому  
химику Я. Вант-Гоффу. Их работы увлекли  
юного Николая Семёнова еще в годы учебы в  
Вольском и Самарском реальных училищах. Хотя  
Н. Н. Семёнов родился (15 апреля 1896 г.) в  
Саратове, «среднее» образование ему пришлось  
получать в реальных училищах по месту служ-  
бы своего отца. А в 1913 г. он уехал на учебу в  
Петербургский университет.

Кстати, одаренность в области науки в воз-  
расте 14–17 лет, как считал Николай Николаевич,  
неудержимо проявляется прежде всего в том,  
что «подросток начинает увлекаться всякого  
рода опытами и в меру своих знаний стремится  
к наивному, но творческому осмысливанию этих  
опытов. Отсюда возникает стремление почитать  
научные и технические книги и журналы сверх  
программы». «Я не знаю ни одного ученого, –  
писал Николай Николаевич, – как из моих свер-  
стников, так и из добившихся научных успехов  
моих учеников, который именно в этом возрасте  
не проявил бы подобной активности. Такого  
рода одаренность не имеет прямого отношения  
к сумме знаний. Последнее очень зависит от  
качества школы, где учится молодой человек, от  
образованности его родителей и т.п. Одаренность  
же, оцениваемая по его творческой активности,  
практически не зависит от этих обстоятельств и  
одинаково видна у окончивших школу в деревне  
и городе, у детей родителей разных слоев населе-





ния. Она выражается прежде всего в страстном стремлении к знаниям, к творческой активной любознательности в какой-либо области науки или техники. Это качество, конечно, развивается тем полнее, чем лучше способствует этому средняя школа» [2, с. 487]. И далее Н. Н. Семёнов добавлял: «Не надо думать, что одаренность или неодаренность к науке делит людей на какие-то категории. Это неверно. Верно лишь то, что для занятия наукой ум должен быть определенным образом направлен».

Здесь уместно вспомнить, что самому Николаю Николаевичу повезло с учителем физики в выпускном классе Самарского реального училища. Им был молодой выпускник Казанского университета Владимир Иванович Кармилов (1889–1954), впоследствии внесший пионерский вклад в развитие магнитобиологических методов лечения [5, 6]. Его дружба с Семёновым продолжалась многие годы, а в Институте химической физики, который Семёнов возглавлял вплоть до своего 90-летия (1986), несколько десятилетий проработали три поколения Кармиловых.

### **Семёнов и Атомный проект СССР**

Открытие Н. Н. Семёновым механизмов воспламенения и взрывов как тепловых, так и на основе разветвленных цепных реакций имело глобальное естественнонаучное значение и сыграло огромную роль при реализации Атомной программы СССР [7]. Как писал научный руководитель советского Атомного проекта Ю. Б. Харитон, «поскольку Николай Николаевич сам работал с разветвляющимися цепными реакциями и нас приучил к этой культуре, этому мышлению, нам было легко после исследований фосфора перейти к работе с ядерными цепными реакциями деления. Весь прошлый опыт Института химической физики позволил нам очень быстро войти в новую область. <...> По существу, Николай Николаевич был одним из тех, кто предопределил наш успех в решении урановой проблемы» [3, с. 438, 439]. Харитон свидетельствовал:

*«Еще задолго до открытия явления деления урана Н. Н. что-то чувствовал, его интуиция, как я уже говорил, в этом плане была поразительной. Я отлично помню, как он буквально хватал людей, тащил их к доске и пытался им толковать, как можно использовать открытые Э. Ферми эффекты ядерных реакций под влиянием нейтронов. От него тогда отмахивались. А он, я уверен, явно чувствовал, что мы находимся на пороге скачка ядерной физики» [1, с. 38].*

Значительная часть аппаратуры для измерения параметров атомных взрывов и их поражающих факторов была разработана и изготовлена именно в Институте химической физики, которым руководил Н. Н. Семёнов [3, с. 438].

### **На пути к Нобелевской премии**

Присуждение Нобелевских премий проходило и проходит согласно устоявшимся с 1901 г. правилам и традициям. И учитывается не только, собственно, актуальность, «свежесть», фундаментальная и особая прикладная перспективность номинируемого на премию результата, но и степень его известности и восприятия учёным миром. Международную известность Н. Н. Семёнову приносили его статьи, книги, а также участие в научных конференциях и съездах, личное знакомство с ведущими учёными мира.

Так, одно из заседаний передвижного (Москва – Новгород – Саратов) Шестого Всесоюзного съезда физиков с широчайшим международным участием летом 1928 г. проходило в родном городе Н. Н. Семёнова – Саратове, в Большой физической аудитории Саратовского университета. На съезде присутствовали 5 будущих Нобелевских лауреатов – М. Борн, П. Дебай, П. Дирак, Н. Семёнов, Л. Ландау. На съезде Николай Николаевич выступил с докладом «Die Theorie der explosive Gasreaktionen» [3]. Уже в 1929 г. Н. Н. Семёнов был избран членом-корреспондентом Академии наук СССР, а в 1932 г. – академиком.

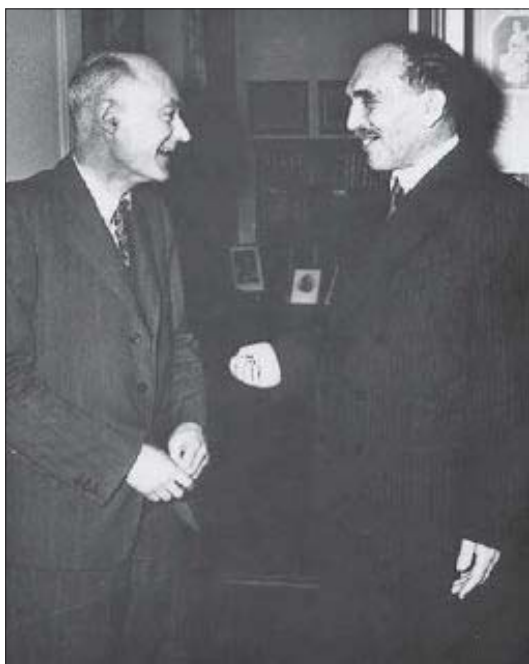
В сентябре 1934 г. Н. Н. Семёнов принял участие в проходившем в Ленинграде VII Менделеевском съезде, посвященном 100-летию со дня рождения Д. И. Менделеева. Этот съезд тоже собрал немало отечественных и зарубежных ученых. По завершении ленинградской части съезда его работа продолжилась на выездных сессиях в Москве и Харькове.

А летом 1945 г. в Москве состоялась юбилейная сессия Академии наук СССР по случаю 220-летия ее основания, на которую прибыло немало известных иностранных ученых. Среди них были, в частности, люди, которые вскоре оказались причастными к получению Н. Н. Семёновым Нобелевской премии: шведские академики А. Ф. Вестгрен и Т. Сведберг, а также английский профессор С. Н. Хиншелвуд. Иностранные гости сессии смогли побывать в научных учреждениях Москвы, а Хиншелвуд и Семёнов – лично познакомиться друг с другом.





Одним из «последствий» юбилейной сессии Академии наук стали положительно встреченные шведскими экспертами выдвижение кандидатуры Н. Н. Семёнова на Нобелевскую премию 1946 г. (номинатором выступил именно С. Н. Хиншелвуд!), а затем и совместное выдвижение Н. Н. Семёнова и С. Н. Хиншелвуда на Нобелевскую премию в 1947 и 1948 гг. (его инициатором стал Т. Сведберг, нобелевский лауреат 1926 г.). Вывод Сведберга был таков: работы обоих ученых носят фундаментальный характер и удачно дополняют друг друга. Тем не менее премиальная процедура в нобелевском комитете по химии в отношении этой премии затянулась на целое десятилетие, причем в основном в связи с задержкой советской стороной представления в нобелевский комитет необходимых сведений о научной деятельности соискателя премии. За это время Семёнов, будучи академиком, успел получить восстановленные в стране научно-образовательные отличия – ученую степень доктора химических наук (1946) и ученое звание профессора (1950), вторую по счету Сталинскую премию (1949), правительственные награды.



Сэр С. Н. Хиншелвуд и академик Н. Н. Семёнов<sup>3</sup>

В 1950 г. Хиншелвуд вторично номинировал Н. Н. Семёнова на Нобелевскую премию. Затем «эстафету» по «продвижению» Семёнова и Хиншелвуда к Нобелевской премии принял

<sup>3</sup> Фото из книги: Манелис Г. Б. Химфизики. Черно-головка : Ред.- изд. отдел ИПХФ РАН, 2011. 160 с.

эксперт нобелевского комитета по химии Ларс Гуннар Силлен, профессор Стокгольмского технологического института. Начиная с 1952 г. Силлен направил в посольство СССР несколько полагавшихся запросов на советских кандидатов на получение Нобелевской премии по химии, называя в их числе имя Н. Н. Семёнова и прося выслать оттиски его последних научных трудов. Премия могла состояться уже в 1953 г., но требуемый материал Силлен получил лишь в ... декабре 1954 г., что по срокам не подходило даже для выдвижения на премию 1955 г., когда номинатором выступил тот же Силлен. Весомым аргументом для него было личное знакомство с членами представительной делегации советских физико-химиков, участвовавших в проходившем в конце июля – начале августа 1953 г. в Стокгольме XIII Международном конгрессе по общей и прикладной химии. Хотя представление из Москвы на Семёнова опоздало (!) и в следующем, 1956-м, году, Ларс Гуннар Силлен вновь и на этот раз успешно выдвинул кандидатуру Н. Н. Семёнова на получение Нобелевской премии в 1956 году!<sup>4</sup>

#### Нобелевский фестиваль

10 декабря 1956 г. Николай Николаевич Семёнов получил из рук короля Швеции Густава VI диплом и золотую медаль с профилем Альфреда Нобеля. Премию с ним разделил учёный из Оксфордского университета сэр Сирил Норман Хиншелвуд.

Семёнов и Хиншелвуд вели тематически близкие исследования, оба достигли значимых результатов. Хиншелвуд в своих работах опирался на открытия Семёнова, а Семёнов, в свою очередь, цитировал Хиншелвуда. За близкие научные результаты получение Нобелевской премии сразу двумя или тремя учёными допускалось, но только совместно (в один год, не по «очередности» в разные годы). Присуждение премии только одному из них навсегда перекрывало дорогу к нобелевским лаврам за близкие достижения другому. Тем не

<sup>4</sup> Историю присуждения Нобелевских премий представителям СССР на основе архивных данных нобелевских комитетов и отечественных архивов исследовал А. М. Блох в книге «Советский Союз в интерьере Нобелевских премий» [8]. Часто советские номинанты не участвовали в конкурсах из-за бюрократических проволочек с представлением необходимой информации в нобелевские комитеты. Препградой для получения премий нашими учеными могла стать и недооценка истинного значения их научных достижений (скажем, большое значение для нобелевских комитетов имели мнения прежде всего шведских ученых). И тем значимее воспринимается нобелевское отличие Н. Н. Семёнова!



менее сэр Сирил Хиншелвуд продемонстрировал удивительный пример научной этики, дважды (в 1946 и 1950 гг.) выступив в роли номинатора своего потенциального «соперника»!

Можно отметить, что и Н. Н. Семёнов отличался научной добропорядочностью. Он, к примеру, никогда не соглашался на вписывание своего авторства в работы, в которых он не принимал непосредственного участия, хотя их постановка могла идти от него.

В Стокгольм Н. Н. Семёнова с супругой сопровождал тогдашний посол Швеции в СССР Рольф Сульман. Программа пребывания Семёновых в Швеции была распланирована по часам [8]. Вместе с другими лауреатами и почетными гостями Нобелевского фонда они остановились в Гранд-отеле, где в 1956 г. были вывешены флаги тех стран, представители которых в тот год получали Нобелевские премии, – СССР, США, Великобритании, ФРГ и Испании.

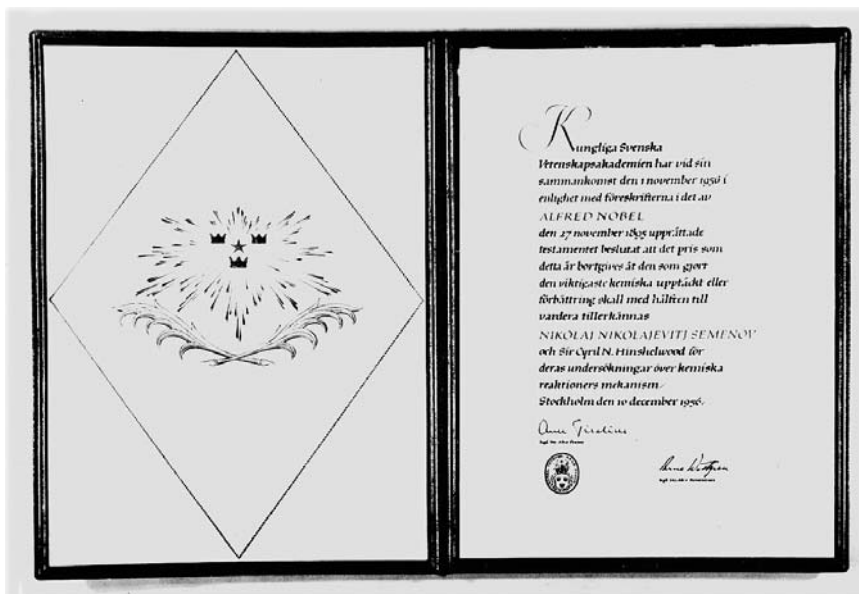


Вручение Н. Н. Семёнову золотой медали и диплома лауреата Нобелевской премии, 10 декабря 1956 г.

Вручение Нобелевских премий проходило в Концерт-холле с залом на 2000 человек. За главными участниками торжества (шведской королевской семьей, лауреатами, членами нобелевских комитетов по всем направлениям присуждения премий) закреплялись места на сцене. За несколько часов до начала церемонии вручения премий (в 4.30 пополудни) в Концертном зале (в 11.30 утра) прошла своего рода репетиция лауреатов, на которой их познакомили с местами на сцене, церемонией встречи с королем Шве-

ции, очередностью поклонов в сторону короля, членов нобелевских комитетов, а также публики в зале, встречавшей новоиспеченных лауреатов аплодисментами.

На последовавшем затем банкете, который проводился в тот год в Большом зале приемов Шведской Академии наук, Н. Н. Семёнов выступил с краткой речью-тостом. На сайте [nobelprize.org](http://nobelprize.org) размещен текст этой речи. Там же можно узнать и меню нобелевского обеда 1956 г: лосось с красным вином по-мадридски, индейка в желе,



Диплом лауреата Нобелевской премии Н. Н. Семёнова

винный соус, парфе из лапландской ежевики, вина из урожаев винограда 1949 и 1953 гг., кофе<sup>5</sup>.

В своей нобелевской лекции, состоявшейся 11 декабря в Технологическом институте Высшей технической школы Стокгольма, Н. Н. Семёнов наметил новые горизонты исследований: «Теория цепной реакции открывает возможность ближе подойти к решению главной проблемы теоретической химии – связи между реакционной способностью и структурой частиц, вступающих в реакцию. <...> Вряд ли можно в какой бы то ни было степени обогатить химическую технологию или даже добиться решающего успеха в биологии без этих знаний. <...> Необходимо соединить усилия образованных людей всех стран и решить эту наиболее важную проблему для того, чтобы раскрыть тайны химических и биологических процессов на благо мирного развития и благоденствия человечества» [9].

Вечер 11 декабря 1956 г. завершился у Николая Николаевича и других нобелевских лауреатов обедом у короля. Во время пребывания в Швеции Н. Н. Семёнов выступил с докладом в Химическом обществе Швеции, посетил Нобелевский институт химии, познакомился с университетом в Упсале. Побывал он и в Обществе «Швеция – СССР». Впоследствии он возглавил «симметричное» общество «СССР – Швеция». 13 декабря все лауреаты оказались вовлеченными в предрождественский шведский праздник – день

<sup>5</sup> Нобелевский банкет оплачивается шведским королем. См. : <http://www.mk.ru/science/2016/10/03/arkhivarius-nobelevskogo-komiteta-rasskazal-komu-vruchili-premiyu-po-oshibke.html>

Санта-Люсии<sup>6</sup>. Три дня отводилось для осмотра Стокгольма и посещения музеев. Часть полученной денежной составляющей премии Семёнов тогда потратил на приобретение небольшого (миньон) рояля «Стейнвей» для дочери Людмилы. Инструмент через три месяца доставили морем [1, с. 215].

#### Н. Н. Семёнов и Саратовский университет

Родившись в Саратове и проведя детские годы на саратовской земле, Николай Николаевич Семёнов всегда тепло принимал гостей из родного города, сотрудников физического и химического факультетов СГУ, приезжавших на стажировку в Институт химической физики и на возглавлявшуюся им кафедру химической кинетики Московского государственного университета. С помощью Семёнова в 1950-х гг. на физическом факультете был «налажен» выпуск специалистов по химической физике, наиболее талантливые из которых продолжили обучение в аспирантуре у Семёнова в Москве, а затем трудились в Институте химической физики Академии наук. Среди них Александр Михайлович Чайкин, соавтор совместного с Н. Н. Семёновым открытия «Явление энергетического разветвления цепей в химических реакциях» (приоритет от 1962 г.), ведущие доктора наук Валерий Павлович Балахнин, Владимир Иванович Веденеев, Евгений Евгеньевич Никитин...

<sup>6</sup> Нобелевские мероприятия подробно описал российский нобелевский лауреат по физике 1958 г. И. Е. Тамм в выступлении «О торжественной церемонии в Швеции» [3, с. 320–322].





Защита дипломной работы А. М. Чайкиным в Саратовском университете, 1952 г.

В начале октября 1983 г. Н. Н. Семёнов с небольшой делегацией Института химической физики приезжал в Саратовский университет (см. подробнее [6]). В ее состав входили член-корреспондент (впоследствии академик) Академии наук СССР Александр Евгеньевич Шилов, супруга Николая Николаевича кандидат (впоследствии доктор) химических наук

Лидия Григорьевна Щербакова-Семёнова, кандидат технических наук Антонина Федоровна Абашкина, помощник Н. Н. Семёнова Павел Семёнович Костиков.

Этот приезд имел интересную предысторию, связанную с написанием саратовским писателем, журналистом и краеведом Владимиром Ильичем Вардугиным повести о Н. Н. Семёнове



Н. Н. Семёнов и В. И. Вардугин в Барвихе, июнь 1983 г.



Встреча Н. Н. Семёнова на Саратовском вокзале, октябрь 1983 г. (на фото – автограф Н. Н. Семёнова)





«Тайна огня» [10]<sup>7</sup>. Любезно приглашенный в Москву для бесед с академиком в июне 1982 г., Вардугин в течение года собирал дополнительные материалы, связанные в основном с детскими и юношескими годами Семёнова: ездил в Широкий Буерак, где провел детство Семёнов, работал в архивах, просматривал старые газеты, получил воспоминания от сестры Семёнова Ксении Николаевны, проживавшей в Краснодаре. В июне 1983 г. он повез книгу в Барвиху, где отдыхал Семёнов.

Первого октября 1983 г. делегацию Института химической физики руководители города встретили цветами на вокзале, а затем в течение трех дней показывали город, знакомили с исследовательскими институтами, Радищевским художественным музеем, панорамой города со стороны Волги. В Увече Николай Николаевич обратил внимание на горящий газовый факел, называемый в народе «Лисий хвост», и высказал замечание словами Д. И. Менделеева: «Что же вы тут ассигнации-то сжигаете?».

Однажды Семёновы подошли к бюсту дважды Героя Социалистического Труда Николая Николаевича Семёнова, установленному на пересечении улиц Астраханской и Вавилова...

**Вместо заключения.  
Есть пророк в своем Отечестве!**

Получение Нобелевской премии в 1956 г. существенно укрепило тогдашнее общественное положение Николая Николаевича, добавив ему дополнительные обязанности в Академии наук СССР и как депутату Верховного Совета СССР. В течение 13 (!) лет перед этим ему пришлось терпеливо нести бремя бесплодных дискуссий с упорными противниками его теории цепных разветвленных реакций в Московском университете<sup>8</sup>.

<sup>7</sup> Название книги перекликается с содержанием теорий, которые разработал Семёнов. Начальный же эпизод книги (описание пожара) тоже не случаен: в день рождения Семёнова, как выяснил Вардугин, в городе пожар и случился!

<sup>8</sup> По общему признанию, Семёнов был доброжелательным человеком. Он помогал многим, кто обращался к нему за помощью по различным вопросам. И даже в своем оппоненте мог разглядеть симпатичные для себя черты (например, умение поддерживать интересную беседу на разные темы). Такого человека после острой дискуссии он мог подвезти на своем автомобиле, чтобы послушать его вне пределов научного спора.

«Директором Н.Н. был совершенно необычным, — писал Ю. Б. Харитон. — Если у кого-нибудь появлялась свежая идея, он радовался этому и всячески помогал ее реализовывать. — вот это его качество много давало все-му делу. Все его очень любили и уважали. Все время, что

Подвергался Семёнов и серьезной государственной «опале», будучи отстраненным от атомной программы незадолго до испытательного взрыва первой атомной бомбы.

Тем не менее его жизненный путь увенчали две звезды Героя Социалистического Труда, 9 орденов Ленина (высшая награда СССР), орден Октябрьской революции (второй по значимости советский орден), орден Трудового Красного Знамени, медали. Он получил Ленинскую и две Сталинские премии. Под руководством Н. Н. Семёнова химическая физика пережила настоящий расцвет. Тематика исследований возглавляемого Н. Н. Семёновым Института химической физики постоянно обогащалась и сопровождалась практическими плодами (в частности, и в области синтеза полимеров). Появился филиал Института химической физики в Подмоскowie — Институт проблем химической физики в Черноголовке, который стал образующим для Научного центра РАН в этом наукограде<sup>9</sup>.

Семёнов был одновременно и благодарным учеником, и умелым руководителем для молодых. Он всегда с признательностью отзывался и о В. И. Кармилове, и об академике Абраме Федоровиче Иоффе, который увлек его в университетские годы «эрудицией в новой физике, фейерверком своих идей, своим научным стрем-

я работал с Н. Н., я его просто боготворил» [3, с. 437].

И еще у него была симпатичная привычка называть некоторых друзей и молодых людей ласковыми именами. В переписке, например, с П. Л. Капицей, он называл его «Петенькой», хотя тот в ответ обращался к нему как «Колька» [3]. Ласковыми именами он называл при беседе и двух «милых собутыльников» («терминология» одного из них), заявившихся к нему после некоего «празднования» («излишне розовыми» и с расстройством навыков фотографирования) брать интервью накануне его 90-летия в 1986 г. «Научный обозреватель» в стиле «заезженной пластинки» донимал академика и нобелевского лауреата вопросом: «В детстве Вы пасли гусей?» Одетый с иголочки (пиджак с многочисленными наградами «без дела» висел на соседнем стуле), дворянин по происхождению, Николай Николаевич тонко поставил вопрошающего на место. О таких деталях «визита к нобелевскому лауреату» «Фотограф» поведал уже в постсоветское время, в 2000-е годы. А в 1986–1987 гг. целью визита к академику называлось высшее желание «сделать снимок человека, достойно прожившего на земле». Действительно, одни из последних прижизненных фотографий Николая Николаевича были сделаны тогда. В более поздней же и неоднократно повторенной публикации «Фотографа» встречаются различные пассажи, не соответствующие элементарным нормам приличия, за которые становится стыдно за их автора.

<sup>9</sup> И не под влиянием ли, в частности, этих успехов Первый секретарь ЦК КПСС Н. С. Хрущев в начале 1960-х гг. «усовершенствовал» ленинскую формулу «Коммунизм есть советская власть плюс электрификация всей страны» таким «дополнением»: «плюс химизация народного хозяйства»?



лением проникнуть в самую глубь механизма явлений природы». Николай Николаевич создал и свою блестящую научную школу. Среди его ближайших сотрудников и учеников были академики В. В. Воеводский, В. И. Гольданский, Н. С. Ениколопов, Я. Б. Зельдович, Д. Г. Кнорре, В. Н. Кондратьев, М. А. Садовский, Ю. Б. Харитон, А. И. Шальников, А. Е. Шилов, Н. М. Эмануэль, А. Б. Налбандян и многие другие.

В 1991 г. Российской академией наук был учреждена памятная золотая медаль имени Н. Н. Семёнова, вручаемая один раз в пять лет за выдающиеся научные достижения в области химии.

Неустаревающая значимость идей Н. Н. Семёнова для развития современной науки была в очередной раз подтверждена в дни работы Международного научного форума «Современные проблемы химической физики», посвященного 120-летию со дня рождения великого русского ученого. Форум проводился 14–15 апреля 2016 г. в Московском университете по решению Президиума РАН. Дополнительную значимость ему придали приветствия участникам, присланные Президентом России В. В. Путиным и председателем правительства РФ Д. А. Медведевым.

Выступавшие на форуме отдали дань академику Семёнову как создателю отечественной школы химической физики, как одному из руководителей Атомного проекта СССР, как научному провидцу, предсказавшему значимость таких проблем, как разработка возобновляемых источников энергии, создание твердого ракетного топлива, использование солнечной энергии, мониторинг состояния климата. При обсуждении перспектив исследований, основанных на продолжении идей Н. Н. Семенова, участники форума обращались к таким проблемам, как горение и взрывы, эффективная солнечная энергетика, биофотоника, самоорганизация в полимерных системах, перспективы создания многокомпонентных материалов, необычные «запутанные» магнитные и электронные свойства полифункциональных нитрозильных комплексов железа<sup>10</sup> [11].

Заключительный аккорд «семёновского» года «прозвучал» 23 декабря 2016 г. в Черноголовке. В этот день на центральной площади города – площади имени Ф. И. Дубовицкого – состоялось от-

крытие масштабного, многопланового памятника основателям Черноголовки – академику Николаю Николаевичу Семёнову и первому уполномоченному Президиума Академии наук по научному центру в Черноголовке, члену-корреспонденту Академии наук Федору Ивановичу Дубовицкому.

Как отмечал академик А. Е. Шилов, «умение предвидеть роль физики в развитии химии XX века, осознать исключительную роль биологии в будущем развитии химии, способность самому погружаться в решение важнейших проблем, воодушевлять учеников и сотрудников – все это характеризует Н. Н. Семёнова как уникальное явление в отечественной и мировой науке» [12].

### Список литературы

1. Воспоминания об академике Николае Николаевиче Семёнове. М. : Наука, 1993. 302 с.
2. Семёнов Н. Н. Избранные труды : в 4 т. / отв. ред. А. Е. Шилов, Г. Б. Сергеев. М. : Наука, 2006. Т. 4. О времени и о себе. 611 с.
3. Капица, Тамм, Семёнов в очерках и письмах. М. : Вагриус ; Природа, 1998. 576 с.
4. Семёнов Н. Н. Цепные реакции. Л. : Госхимиздат, 1934. 555 с.
5. Аникин В. М. Физик-инноватор, земляк, учитель и друг Н. Н. Семёнова Владимир Иванович Кармилов // Изв. Сарат. ун-та. Нов. сер. Сер. Физика. 2016. Т. 16, вып. 1. С. 44–54.
6. Аникин В. М., Усанов Д. А. Николай Николаевич Семёнов : волжские сюжеты жизни // Изв. Сарат. ун-та. Нов. сер. Сер. Физика. 2016. Т. 16, вып. 2. С. 109–121.
7. Чернышев А. К. Николай Николаевич Семёнов – выдающийся ученый и организатор Атомного проекта СССР. Саров : РФЯЦ-ВНИИЭФ, 2012. 79 с.
8. Блох А. М. Советский Союз в интерьере Нобелевских премий. 2-е изд., перераб. и доп. М. : ФИЗМАТЛИТ, 2005. 880 с.
9. Семенов Н. Н. Нобелевская лекция. URL : [http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/1956/semenov-lecture.html](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1956/semenov-lecture.html)
10. Вардугин В. И. Тайна огня : Повесть о Н. Н. Семёнове. Саратов : Приволж. кн. изд-во, 1986. 144 с.
11. «Жить вместе с наукой». Международный форум «Современная химическая физика», посвященный 120-летию со дня рождения лауреата Нобелевской премии Н. Н. Семёнова. URL : <http://www.msu.ru/news/zhitvmeste-s-naukoj.html> (дата обращения: 01.01.2017).
12. Шилов А. Е. Н. Н. Семёнов и его роль в науке. URL : <http://www.chph.ras.ru/semenov.html> (дата обращения: 01.01.2017).

<sup>10</sup> Видеоотчет о Международном научном форуме «Современные проблемы химической физики» размещен на сайте видеоархива МГУ: <http://media.msu.ru/?cat=429>.

### Образец для цитирования:

Аникин В. М. Первая нобелевская (к 60-летию присуждения Нобелевской премии академику Н. Н. Семёнову) // Изв. Сарат. ун-та. Нов. сер. Сер. Физика. 2017. Т. 17, вып. 3. С. 201–211. DOI: 10.18500/1817-3020-2017-17-3-201-211.



**The First Nobel Prize (To the 60th Anniversary of the Awarding of the Nobel Prize to Academician N. N. Semenov)**

**V. M. Anikin**

Valery M. Anikin, ORCID 0000-0002-6506-6997, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, anikinvm@info.sgu.ru

The article is dedicated to the 60th anniversary of obtaining the Nobel Prize in Chemistry by greatest Russian scientist Nikolai N. Semenov. The stages of life's journey of N. N. Semenov to the highest international scientific distinctions and the characteristics of his personality are early fascination with science, brilliant successes, a rare insight in the formulation of topical scientific problems, wonderful, "Nobel" experiment, initially disputed by a qualified reviewer, deep theoretical understanding of experimental studies, the discovery of a new mechanism for ignition and explosion, including an atom explosion, creation of a scientific basis for a new branch of science – chemical physics, advocating the new theory, and personal dignity. We also tell about the Nobel festivities in Stockholm in 1956.

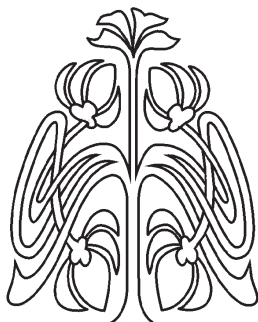
**Key words:** Academician Nikolai Semenov, Nobel Prize.

**References**

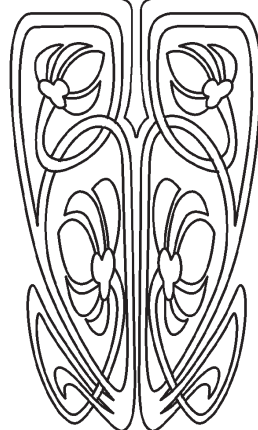
1. *Vospominaniya ob akademike Nikolae Nikolaeviche Semjonove* [Memories about Academician Nikolai Nikolaevich Semenov]. Moscow, Nauka Publ., 1993. 302 p. (in Russian).
2. Semenov N. N. *Selected Works*: in 4 vol. Vol. 4. About the time and about himself. Eds. A. E. Shilov, G. B. Sergeev. Moscow, Nauka Publ., 2006. 611 p. (in Russian).
3. *Kapitsa, Tamm, Semjonov v ocherkah i pis'mah* [Kapitsa, Tamm, Semenov in the essays and letters]. Moscow, Vagrius Publ.; Priroda Publ., 1998. 576 p. (in Russian).
4. Semenov N. N. *Chain reactions*. Leningrad, Goskhimizdat Publ., 1934. 555 p. (in Russian).
5. Anikin V. M. Vladimir I. Karmilov, Physicist, Innovator and Nikolai N. Semenov's Countryman, Teacher, Friend. *Izv. Saratov Univ. (N.S.), Ser. Physics*, 2016, vol. 16, iss. 1, pp. 44–54 (in Russian).
6. Anikin V. M., Usanov D. A. Nikolai N. Semenov: Volga Region Themes of the Life. *Izv. Saratov Univ. (N.S.), Ser. Physics*, 2016, vol. 16, iss. 2, pp. 47–59 (in Russian).
7. Chernyshev A. K. *Nikolaj Nikolaevich Semenov – vydajushhij uchenyj i organizator Atomnogo proekta SSSR* [Nikolay N. Semenov as an outstanding scientist and organizer of the Soviet Atomic Project]. Sarov, VNIIEF Publ., 2012. 79 p. (in Russian).
8. Bloch A.M. *Sovetskij Soyuz v inter'ere Nobelevskih premij* [Soviet Union in the interior of the Nobel Prizes]. 2nd ed. Moscow, FIZMATLIT Publ., 2005. 880 p. (in Russian).
9. Semenov N. N. *Nobel Lecture*. Available at: [http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/1956/semenov-lecture.html](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1956/semenov-lecture.html)
10. Vardugin V. I. *Tajna ognja. Povest' o N. N. Semenove* [Fire Mystery: Tale of N. N. Semenov]. Saratov, Privolzh. knizh. izd-vo, 1986. 144 p. (in Russian).
11. «Living together with science». International forum «Modern chemical physics» devoted to the 120th anniversary of the birth of Nobel Prize winner N. N. Semenov. Available at: <http://www.msu.ru/news/zhit-vmeste-s-naukoy.html> (accessed 01 January 2017) (in Russian).
12. Shilov A. E. *N. N. Semenov i ego rol' v nauke* [N. N. Semenov and his role in science]. Available at: <http://www.chph.ras.ru/semenov.html> (accessed 01 January 2017) (in Russian).

**Cite this article as:**

Anikin V. M. The First Nobel Prize (To the 60th Anniversary of the Awarding of the Nobel Prize to Academician N. N. Semenov). *Izv. Saratov Univ. (N.S.), Ser. Physics*, 2017, vol. 17, iss. 3, pp. 201–211 (in Russian). DOI: 10.18500/1817-3020-2017-17-3-201-211.



**ПОДПИСКА**



**Подписка на II полугодие 2017 года**

Индекс издания в объединенном каталоге  
«Пресса России» 36015, раздел 30  
«Научно-технические издания.  
Известия РАН. Известия вузов».

Журнал выходит 4 раза в год

Цена свободная

Оформить подписку онлайн можно  
в интернет-каталоге «Пресса по подписке» ([www.akc.ru](http://www.akc.ru))

**Адрес Издательства**

**Саратовского университета:**

410012, Саратов, Астраханская, 83;

**Тел.:** +7 (845-2) 51-45-49, 52-26-89

**Факс:** +7 (845-2) 27-85-29

**E-mail:** [izvestiya@sgu.ru](mailto:izvestiya@sgu.ru)

**Адрес редколлегии серии:**

410012, Саратов, Астраханская, 83,

СГУ имени Н. Г. Чернышевского,  
физический факультет

**Тел./факс:** +7 (845-2) 51-14-30

**E-mail:** [fizika.sgu@bk.ru](mailto:fizika.sgu@bk.ru)

**Website:** <http://fizika.sgu.ru>