

колебания углов $\gamma(\text{C—C—N}, \text{C—N—C})$ и неплоские $\kappa(\text{C—N})$ пиридинового кольца, разрешены с компонентами 686, 695, 762, 770 см^{-1} соответственно. Можно считать, что Pdpy_2Cl_2 изоструктурен платиновому цис-изомеру Ptpy_2Cl_2 , изученному в [5]; для него величина расщепления $\Delta\nu$ равнялась $\sim 8 \text{ см}^{-1}$ для обеих полос. В спектрах КР Pdpy_2Cl_2 наблюдается лишь один дублет (645, 656 см^{-1}). Полоса 748 см^{-1} $\kappa(\text{C—N})$ свободного пиридина оказывается смещенной к 740 см^{-1} и, по-видимому, является наиболее интенсивной длинноволновой компонентой дублета, высокочастотная составляющая которого не наблюдается.

В хлорпиридинатных комплексах Co, Rh, Ir симметрии D_{4h} с четырьмя гетероциклическими аминами в плоскости σ_h расщепление полос ~ 680 и $\sim 760 \text{ см}^{-1}$, очевидно, должно отсутствовать, как и у транс-изомеров PtCl_4py_2 и PtCl_2py_2 [8]. Напротив, у их цис-аналогов вследствие наличия двух несимметричных координат py—Me—Cl и одной симметричной py—Me—py , ($\text{Me}=\text{Co}, \text{Rh}, \text{Ir}$) эти полосы должны быть сложными. Действительно, на примере кобальтового соединения $[\text{Co}(\text{py}_4\text{Cl}_2)\text{Cl} \times 6\text{H}_2\text{O}]$ (см. рис. 2) легко проследить за появлением в ИКС интенсивной триплетной полосы с компонентами 755, 762, 765 см^{-1} , которые можно отнести, например, к внеплоскостным колебаниям в кольцах пиридина типа $\kappa(\text{C—N})$, расположенных в транс- и цис-позициях. Аналогичный эффект наблюдается и в СКР (полосы 772 и 650 см^{-1} разрешены).

Таким образом, полученные результаты можно принять за основу при анализе спектральных изменений состояния хлорпиридиновых комплексов кобальта, родия и иридия при взаимодействии их с биологическими системами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Rosenberg B.—Natur, 1965, v. 205, p. 698.
2. Cleare M. J.—Coord. chem. Rev., 1974, v. 12, p. 349.
3. Pfeiffer M.—Spectrochim. Acta, 1974, v. 30A, p. 341.
4. Chottard G.—Compt. Rend., 1972, v. 274, p. 1116.
5. Hendra P. I.—Spectrochim. Acta, 1967, v. 23A, p. 1963.
6. Allan J. R., Brown D. M.—J. Inorg. Nucl. Chem., 1965, v. 27, p. 1305.
7. Adams D. M., Chatt J.—J. Chem. Soc., 1961, p. 739.
8. Rao S.—Z. anorg. u. allg. chem., 1960, Bd. 304, S. 176.

Поступила в редакцию
5.03.79.

НИИ ПФП

УДК 577.37

Б. А. ТАТАРИНОВ, В. А. ЦВИРКО, С. Н. ЧЕРЕНКЕВИЧ, А. И. КОМЯК

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА МАЛОУГЛОВОГО СВЕТОРАССЕЯНИЯ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ КЛЕТОК В ПРОЦЕССЕ ИХ СТРУКТУРНЫХ ПЕРЕСТРОЕК

Форма и размеры клеток и их органелл *in vitro* или при функционировании в организме, а также при внешних воздействиях подвержены различным изменениям. Большинство используемых методов регистрирует наличие структурных изменений, но не позволяет проследить за размерами частиц в процессе эксперимента [1]. Применение широко распространенных методов оптической и электронной микроскопии осложняется необходимостью специальной обработки исследуемых препаратов, которая зачастую приводит к структурным изменениям клеток и к значительным ошибкам при определении размеров клеток [2].

Методы, основанные на измерении интенсивности света, рассеянного под разными углами [3], позволяют избежать указанных трудностей и применимы для изучения различных типов частиц. Чтобы определить

размеры частиц в пределах 0,2—100 мкм, необходимо проводить измерения интенсивности света при малых углах (до 10—20°). Указанный метод неоднократно применялся для установления размеров коллоидных и металлических [4] частиц, а также ряда клеток и их органелл [5].

В настоящей работе описана методика определения размеров частиц с помощью метода малоуглового светорассеяния.

Блок-схема разработанного и изготовленного нефелометра для измерения интенсивности рассеянного под малыми углами света показана на рис. 1. В качестве источника света использован гелий-неоновый лазер 1. С помощью щелей 2 ширина первичного луча уменьшается до 0,5 мм. Прошедший через кювету 4 луч поглощается в светопроницаемой «улитке» 6. Рассеянный свет проходит через серию диафрагм 7, исключаяющих отражение от стенок тубуса и регистрируется фотоэлектронным умножителем ФЭУ-68 9, отобранным по максимальной чувствительности в красной области спектра, питание которого осуществляется стабилизатором ВС-22 10. Сигнал ФЭУ усиливается 11 и подается на самописец 12. Поскольку интенсивность рассеянного света изменяется в пределах пяти порядков в зависимости от угла наблюдения, предусмотрена установка калиброванных нейтральных светофильтров 3, ослабляющих первичный пучок света. Более плавная регулировка чувствительности системы регистрации осуществляется с помощью усилителя. Применение поляризованного лазерного пучка света позволяет получать поляризационные диаграммы рассеяния с помощью поляроида 8 в регистрирующем тубусе гониометра. Определение угла наблюдения рассеянного света осуществляется с помощью системы отсчета гониометра ГС-5 5.

Для исследований применимы как плоская, так и цилиндрическая кюветы. В случае плоской кюветы, которая практически не искажает падающий луч и позволяет выполнять измерения при очень малых углах (порядка 10'), необходимо проводить сложный учет эффектов, связанных с преломлением и отражением света на стенках кюветы [6].

Применение цилиндрической кюветы позволяет избежать этих затруднений при измерении в пределах 0,5—150°. Возникающее при этом расхождение луча снимается благодаря увеличению диаметра кюветы и ее уплощению со стороны падающего луча. Все представленные ниже результаты получены с помощью цилиндрической кюветы. Необходимые поправочные коэффициенты, учитывающие эффекты преломления и отражения на стенках кюветы и изменение «видимого» рассеивающего объема, определялись экспериментально по методу [7]. В качестве калибровочных были использованы растворы полимеров, для которых интенсивность света, рассеянного при малых углах, остается практически постоянной. Это водные растворы поливинилового спирта (4%) и полигликоля (5%), раствор полиэтиленгликоля в хлороформе (10%) и полиакриламидный гель (7%). Относительная ошибка измерения интенсивности рассеянного света, вычисленная по [8] в случае дебаевского фактора рассеяния для гауссовых клубков составляет менее 1%.

Изготовленный прибор обладает рядом преимуществ по сравнению с аналогичными моделями [9]. Так, в связи с использованием света длинной волны 632,8 нм не происходит значительного снижения интенсивности рассеянного света за счет его активного поглощения, поскольку

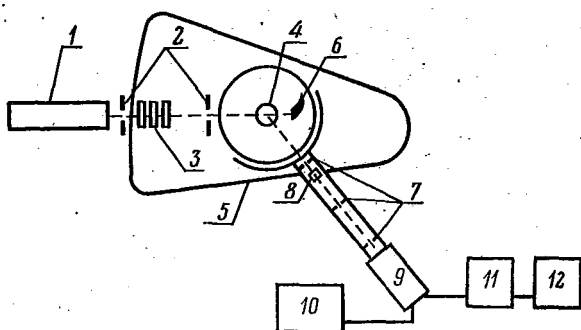


Рис. 1. Схема малоуглового нефелометра.

длина волны рассеиваемого света лежит вне полос поглощения большинства биообъектов. Это позволяет почти полностью исключить люминесценцию исследуемых препаратов. Небольшая угловая полуширина первичного луча позволяет регистрировать его интенсивность (I_0) без учета вклада света, рассеянного под малыми углами. Это дает возможность определить относительную интенсивность света, рассеянного под разными углами I_θ/I_0 (I_θ — интенсивность света, рассеянного под углом θ).

Гомогенность исследуемых суспензий в кювете поддерживалась непрерывным перемешиванием. Растворители очищались от возможного загрязнения фильтрованием непосредственно в кювету через стеклянный фильтр ПОР-160. Для исключения многократного рассеяния света на исследуемых частицах, концентрация последних в растворе поддерживалась таким образом, чтобы мутность суспензии не превышала 50%.

Измерение индикатрисы рассеяния позволяет находить размеры частиц в растворе по методу [4]. В этом случае представление индикатрисы рассеяния в координатах $I\theta^2$, θ в логарифмическом масштабе позволяет выделить малоугловой максимум, положение которого (θ_m) линейно связано с радиусом частиц r соотношением $r \cdot \theta_m = \alpha$.

Величина α зависит от длины рассеиваемого света и незначительно изменяется для различных форм частиц. Так, для сферы, диска и цилиндра при $\lambda = 632,8$ нм $\alpha = 12,3 \pm 1,3$ мкм·град. Следовательно, с помощью данного метода можно определять размеры частиц без предварительного установления их формы.

В качестве примера рассмотрим результаты определения размеров эритроцитов, полученных из крови доноров, и их мембран (рис. 2). В исследуемой системе координат индикатрисы характеризуются максимумами в областях $3,5-4,0^\circ$ и $8-10^\circ$. В физиологическом растворе размеры свежеприготовленных эритроцитов 7,4 и 2,3 мкм (соответственно диаметр клеток и их толщина) хорошо совпадают с результатами, полученными с помощью других методов [10]. Размеры очищенных мембран эритроцитов, выделенных по методу [11], составляют 7,8 и 2,55 мкм, что указывает на сохранение формы частиц после гемолиза. При больших углах наблюдения интенсивность рассеянного света для суспензии эри-

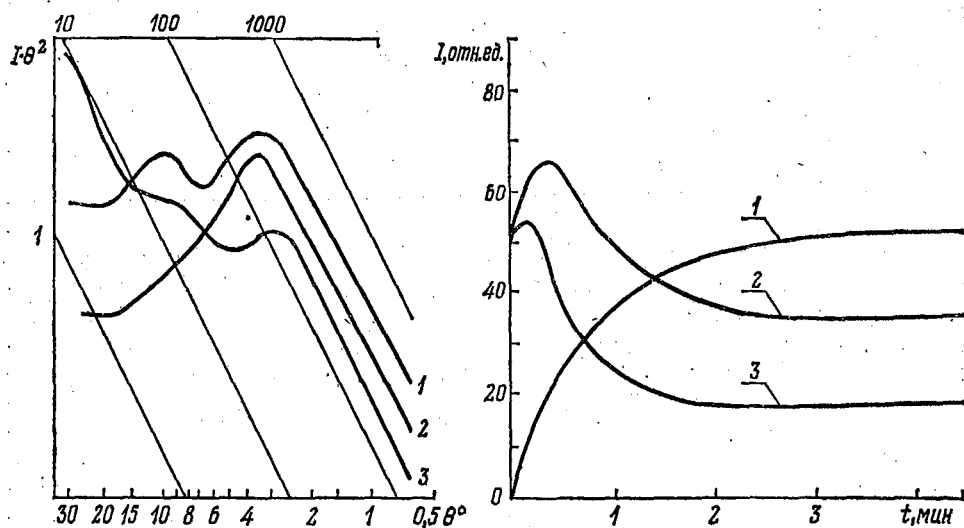


Рис. 2. Индикатрисы светорассеяния для суспензий свежеполученных эритроцитов в 0,15 М NaCl (1), эритроцитов в процессе гемолиза в 0,08 М NaCl (2), мембран эритроцитов (3)

Рис. 3. Изменение интенсивности рассеянного под различными углами света в процессе гипотонического гемолиза:

1 — $\theta_{\text{рас}} = 0^\circ$; 2 — $\theta_{\text{рас}} = 3,5^\circ$; 3 — $\theta_{\text{рас}} = 8^\circ$

троцитов резко уменьшается, в то время как для эритроцитарных мембран ее изменение невелико. Следовательно, в суспензии эритроцитов нет частиц меньших размеров, чем клетки. Эритроцитарные мембраны представляют собой менее гомогенную по размерам систему, в которой содержится большое число мелких обломков. Это указывает на неоднородность препарата мембран эритроцитов, получаемых по методу Доджа [11].

С помощью метода малоуглового светорассеяния можно определять размеры клеток и их органелл в процессе физического воздействия, влияющего на структуру клеток. При этом обнаруживается ряд изменений, которые не могут регистрироваться другими методами. Так, на рис. 3 приведены кинетические кривые гемолиза эритроцитов, вызываемого переводом клеток из физиологического раствора в гипотоническую среду. Кривая 1 отражает характер изменения мутности суспензий, а кривые 2 и 3 — изменение интенсивности света, рассеянного суспензией эритроцитов под углами $3,5^\circ$ и 8° соответственно. Последние кривые описывают изменения частиц, имеющих размеры близкие к $2,3$ и $7,0$ мкм. Наблюдение при различных углах рассеяния позволяет выделить отдельные этапы появления и исчезновения частиц определенного размера на фоне суммарного процесса структурной перестройки клеток. Так как для частиц различного размера характерны свои максимумы в индикатрисе рассеяния, указанный факт может быть использован для наблюдения за изменениями внутриклеточных органелл в нативной клетке.

На основании серии кинетических кривых, полученных при одинаковых условиях, но на различных углах наблюдения представляется возможным построение серии индикатрис рассеяния света на различных стадиях гемолиза эритроцитов. На рис. 2 представлена индикатриса рассеяния эритроцитов через 20 с при их переводе из $0,15$ М NaCl в раствор $0,08$ М NaCl (кривая 3). Вместо двух максимумов, характерных для нативных клеток, появляется один при $3,8^\circ$. Это указывает на то, что на начальном этапе гемолиза эритроцит изменяет свою форму от дискообразной до сферической с диаметром $6,5$ мкм.

Предварительные эксперименты показали возможность применения описанного метода для исследования структурных состояний лейкоцитов, тромбоцитов и клеток микроорганизмов при лизисе, действии на клетки лекарственных и токсических соединений, изменении pH, ионной силы, температуры раствора и т. д.

Таким образом, метод малоуглового светорассеяния перспективен для изучения морфологических изменений клеток и их органелл.

ЛИТЕРАТУРА

1. Чижевский А. Л. Структурный анализ движущейся крови. — М., 1959, с. 87.
2. Поликар А. Поверхность клетки и ее микросреда. — М., 1975, с. 23.
3. Fiel R. I. — Exp. Cell. Res., 1970, v. 59, p. 413.
4. Sloan C. K. — J. Phys. Chem., 1955, v. 59, p. 834.
5. Fiel R. I., Munson B. R. — Exp. Cell. Res., 1970, 59, 421.
6. Stein B. S., Keane A. I. — J. Polim. Sci., 1955, v. 17, p. 21.
7. Harpst I. A., Krasna A., Zimm B. H. — Biopolymers, 1968, v. 6, p. 585.
8. Hermann I. I., Livingston S. — J. Opt. Soc. Am., 1951, v. 41, p. 460.
9. Aughey W., Boum F. I. — J. Opt. Soc. Am., 1954, v. 44, p. 833.
10. Гольдберг Д. И., Левина Г. Д. Диаметр эритроцитов в норме и патологии. — Томск, 1969, с. 19.
11. Dodge J. T., Mitchell C. — Arch. Biochem. Biophys. 1963, v. 100, p. 119.

Поступила в редакцию
12.03.79.

Кафедра биофизики