



НОВЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ЭЛЛИПСОМЕТРИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ЗАБОЛЕВАНИЙ, СВЯЗАННЫХ С ИЗМЕНЕНИЕМ СТРУКТУРЫ КОЛЛАГЕНА

Р.В. Щелоков

Использование эллипсометрии позволяет неразрушающе контролировать и исследовать физико-химические свойства органических веществ. Сущность метода заключается в исследовании изменения состояния поляризации электромагнитного излучения в результате его отражения или прохождения через изучаемый объект. Метод эллипсометрии относительно долгое время не развивался в связи со сложностью и громоздкостью математической обработки результатов. Со временем развитие техники позволило применять метод эллипсометрии во многих научных областях.

Нам наиболее интересно изучение коллагена, так как он составляет 30 % от общего белка в организме, содержится во многих органах (костях, хрящах, кровеносных сосудах, дермах, роговицах, базальных мембранах, эндотелиях сосудов) и малейшие изменения в его структуре могут привести к заболеваниям различной формы.

Целью данной работы является исследование возможности применения метода эллипсометрии в диагностировании заболеваний, связанных с изменением структуры коллагена.

1. КОЛЛАГЕН И ЕГО МУТАЦИИ

Коллаген (от греч. *kolla* – клей и *...ген*) – фибриллярный белок, составляющий основу соединительной ткани животных (сухожилие, кость, хрящ) и обеспечивающий ее прочность. Коллаген – это жизненно важный элемент для поддержания молодости кожи и ее подтянутого состояния, это строительный белок соединительной ткани. Биологическая роль коллагенов, помимо опорно-механической, заключается в их участии в межклеточном взаимодействии, они влияют на пролиферацию и

дифференцировку клеток, морфогенез органов и тканей в процессе роста и развития организма. Коллагены являются наиболее распространенными животными белками. В организме млекопитающих относительное содержание коллагенов достигает 30 % всех белков. Типичным примером является коллаген IV типа. Этот тип коллагена встречается в базальных мембранах и кровеносных сосудах. Молекула коллагена IV типа является самой длинной молекулой из всех коллагенов и составляет 390 нм, диаметр – 1,5 нм.

Коллаген отличается от всех остальных протеинов, особенно пищевых, высоким содержанием пролина и гидроксипролина. Гидроксипролин не обнаруживается в столь значительных количествах ни в одном другом белке, кроме эластина. Пролин в коллагене присутствует в основном в последовательности глицин-пролин-*X*, где *X* часто представлен аланином или гидроксипролином. Коллаген не содержит цистина или триптофана и, следовательно, не может заменять другие протеины в диете. Присутствие оксипролина и оксилизина резко отличает его от других белков в живых организмах (эти аминокислоты не встречаются в составе других белков). Роль этих аминокислот необычайно важна в стабилизации трехспиральной конформации молекул коллагена.

Как уже говорилось, молекула коллагена состоит из трех пептидных цепей – α -цепей (см. рис. 1). Известно свыше 25 разных коллагеновых α -цепей, каждая из которых кодируется своими генами. Разные комбинации этих генов подвергаются экспрессии в разных тканях. Теоретически такое разнообразие может дать 10 000 типов тройных спиралей в составе коллагена. Однако на сегодняшний день выделено всего лишь 15 типов коллагеновых молекул (изоколлагены) [8].

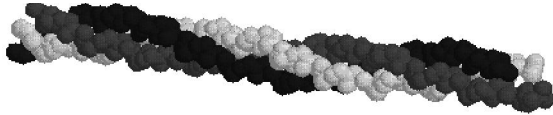


Рис. 1. Тройная спираль α -цепей коллагена [5]

Мутацию рассмотрим на достаточно распространенном примере Синдрома Альпорта. Синдром Альпорта (нефропатия с глухотой семейная) – это ото-окуло-ренальный синдром или наследственный геморрагический нефрит. Заболевание характеризуется прогрессирующим поражением почек, развитием почечной недостаточности, глухоты, поражением глаз (катаракта, сферофакия с вторичной миопией, пигментный ретинит). Болезнь вызывается точечной мутацией гена COL4A5, кодирующей альфа5-цепь коллагена IV типа. Суть мутации заключается в замене Gly на Val в 204 позиции [3, с. 340–345]. Распространенность синдрома Альпорта составляет 1 случай на 5 000 населения.

2. ОПТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ

Оптическая активность молекул хорошо изучена как экспериментально, так и теоретически [4; 9; 10]. Последовательное построение теории проводится с помощью стандартных методов квантовой электродинамики, описывающих проблему двух состояний. В этом случае оптическое вращение рассматривается как двухфотонный процесс рассеяния света на молекуле с поглощением одного и испусканием другого фотона. Вычисление угла поворота плоскости поляризации сводится к вычислению недиагональных матричных элементов в матрице рассеяния, которые для двухуровневого процесса имеют вид:

$$M_{21} = VN_1 \sum_N \frac{\langle \mathbf{k}e^{(2)}; 0 | H_{\hat{a}\hat{q}\hat{a}\hat{e}i} | N \rangle \langle N | H_{\hat{a}\hat{q}\hat{a}\hat{e}i} | \mathbf{k}e^{(1)}; 0 \rangle}{\epsilon_0 - \epsilon_N} = M_{12}$$

где k – волновой вектор;
 $e^{(1)}, e^{(2)}$ – векторы поляризации фотонов, суммирование проводится по всем промежуточным состояниям.

V – объем;
 N_1 – число активных молекул;
 H_{int} – гамильтониан взаимодействия.

Если матричный элемент известен, то оптическое вращение:

$$\hat{O} = i \frac{\omega}{c} M_{21}.$$

Кроме того, должны быть учтены все возможные виды взаимодействия: электрически-дипольное – электрически-дипольное – (\mathbf{p}, \mathbf{p}) , магнитно-дипольное – магнитно-дипольное – (\mathbf{m}, \mathbf{m}) и т. д., а также вклады высших мультиполей – (\mathbf{p}, \mathbf{q}) , то есть полное вращение:

$$\Phi = \Phi(\mathbf{p}, \mathbf{p}) + \Phi(\mathbf{p}, \mathbf{m}) + \Phi(\mathbf{m}, \mathbf{m}) + \Phi(\mathbf{p}, \mathbf{q}).$$

В случае, если все ориентации равновесны, то при усреднении по направлениям обращаются в нуль все слагаемые, кроме скалярного произведения $\langle \mathbf{p} \rangle \langle \mathbf{m} \rangle$. Тогда для дисперсии оптического вращение:

$$\hat{O}(\omega) = \frac{8\pi N_1}{3\hbar c} \sum_N \frac{\omega^2 R_{N0}}{\omega_{N0}^2 - \omega^2 - i\omega \tilde{A}_{N0}}.$$

В этом выражении можно выделить действительную и мнимую часть, первая из которых называется оптическим вращением – ρ , а вторая – круговым дихроизмом – θ . И при небольших значениях кругового дихроизма θ характеризует эллиптичность, а ρ – поворот эллипса поляризации.

$$\rho = \frac{8\pi N_1}{3\hbar c} \sum_N \frac{\omega^2 (\omega_{N0}^2 - \omega^2) R_{N0}}{(\omega_{N0}^2 - \omega^2)^2 + \omega^2 \tilde{A}_{N0}^2}$$

$$\theta = \frac{8\pi N_1}{3\hbar c} \sum_N \frac{\omega^3 R_{N0}}{(\omega_{N0}^2 - \omega^2)^2 + \omega^2 \tilde{A}_{N0}^2}.$$

где $R_{N0} = \text{Im} \langle 0 | \mathbf{p} | N \rangle \langle N | \mathbf{m} | 0 \rangle$ – сила вращения;
 Γ_{N0} – постоянная затухания перехода;
 N_1 – число молекул в 1 см^3 .

3. СВЯЗЬ МЕЖДУ ЭЛЛИПСОМЕТРИЧЕСКИМИ ПАРАМЕТРАМИ

Далее нам необходимо перейти от поляризационных характеристик к эллипсометри-

ческим параметрам. Рассмотрим, как производится переход.

Эллипс поляризации можно описать двумя способами: либо в произвольных осях (x , y), либо вводя собственные оси эллипса (ξ , η). В первом случае достаточно использовать отношение амплитуд A и B и сдвиг фаз δ , во втором – отношение малой и большой полуосей b и a и ориентацию одной из осей (например, большой) относительно заданной плоскости (см. рис. 2).

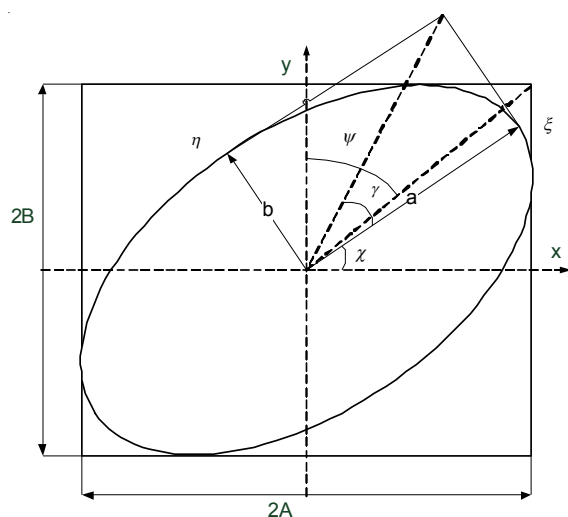


Рис. 2. Эллипс поляризации

В первом случае используются углы:

$$\psi = \arctg\left(\frac{A}{B}\right); \delta = \delta_x - \delta_y.$$

Во втором случае – углы:

$$\gamma = \pm \arctg\left(\frac{b}{a}\right), \chi.$$

Угол χ , отсчитываемый от оси $0x$ против часовой стрелки до направления большой полуоси, называется азимутом. Угол γ называется эллиптичностью.

Таким образом, эллипс поляризации описывается либо углами (ψ , δ), либо углами (γ , χ). Эти углы представляют собой основные эллипсометрические параметры, которые и подлежат измерению в методе эллипсометрии. Зная два из них, всегда можно определить два других.

Связь между эллипсометрическими параметрами:

$$\cos 2\psi = \cos 2\gamma \cos 2\chi. \quad (1)$$

$$\operatorname{tg} \Delta = \frac{\operatorname{tg} 2\gamma}{\sin 2\chi}. \quad (2)$$

$$\gamma = \theta$$

$$\chi = \frac{\pi}{2} - \rho.$$

С помощью (1) и (2) по известным γ , χ определяются ψ , Δ . Эти формулы играют важное значение, поскольку часто непосредственно определяются χ и γ и от них необходимо перейти к ψ и Δ – более традиционным эллипсометрическим параметрам [2].

Рассмотрим эллипсометрические характеристики для биообъекта. Роль биообъекта играет базальная мембрана, содержащая изучаемую молекулы коллагена IV типа, толщина которой в среднем составляет 12 мкм [7].

Для выявления возможности применения метода эллипсометрии для диагностики заболеваний, связанных с изменением структуры коллагена, будем исследовать мутировавшую молекулу коллагена. Мутация является точечной: происходит замена аминокислоты глицин (Gly) на валин (Val) в позиции 204 (68-й кластер).

На рисунках 3 и 4 представлены следующие результаты:

1) рассчитаны эллипсометрические углы как для молекулы коллагена в норме, так и для мутировавшего коллагена, при котором наблюдается синдром Альпорта;

2) в связи с тем что для белков полуширина полосы поглощения варьирует в пределах 30–70 нм [6], то для этих граничных значений были также рассчитаны эллипсометрические углы.

Эллипсометрический угол ψ возрастает до некоторого максимального значения – 0.208° и 0.212° – при длине волны $\lambda = 420$ нм для коллагена «в норме» и при мутации соответственно, что дает разницу в 0.004° . Далее, с увеличением длины волны, наблюдается затухание.

Представленная зависимость носит чисто затухающий характер. Так, при $\lambda = 300$ нм получаем следующие значения: 17.64° и 19.92° для коллагена в норме и при мутации ($\delta\Delta = 2.28^\circ$), а при 800 нм – 4.06° и 6.15° ($\delta\Delta = 2.09^\circ$).

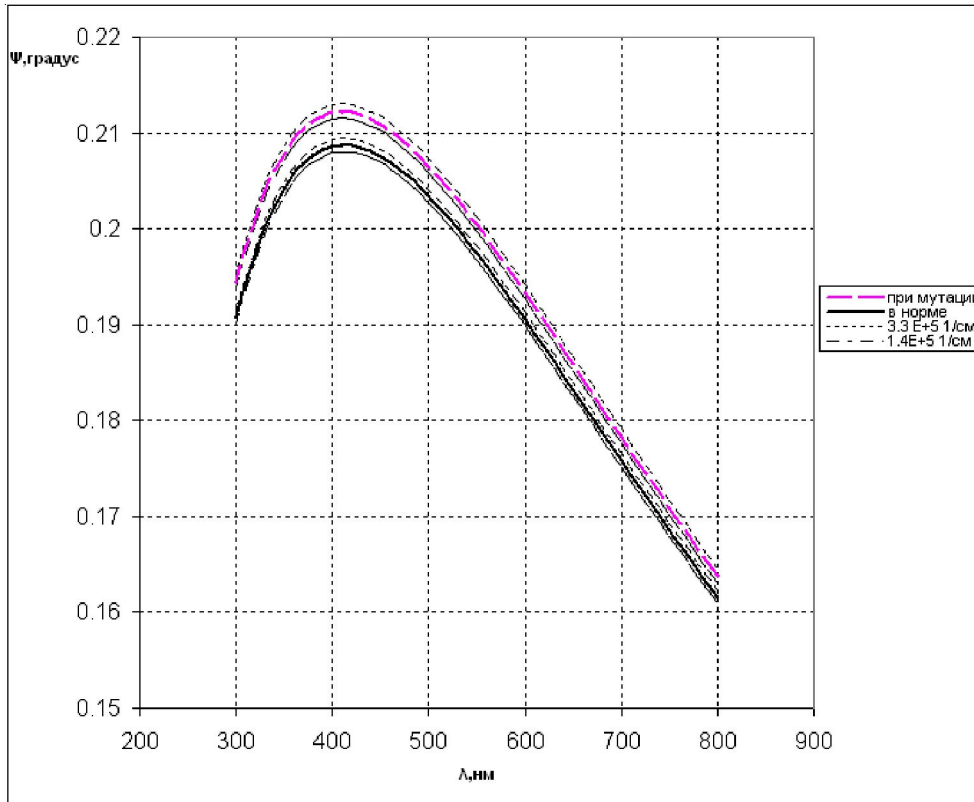


Рис. 3. Расчетная зависимость эллипсометрического угла от длины волны

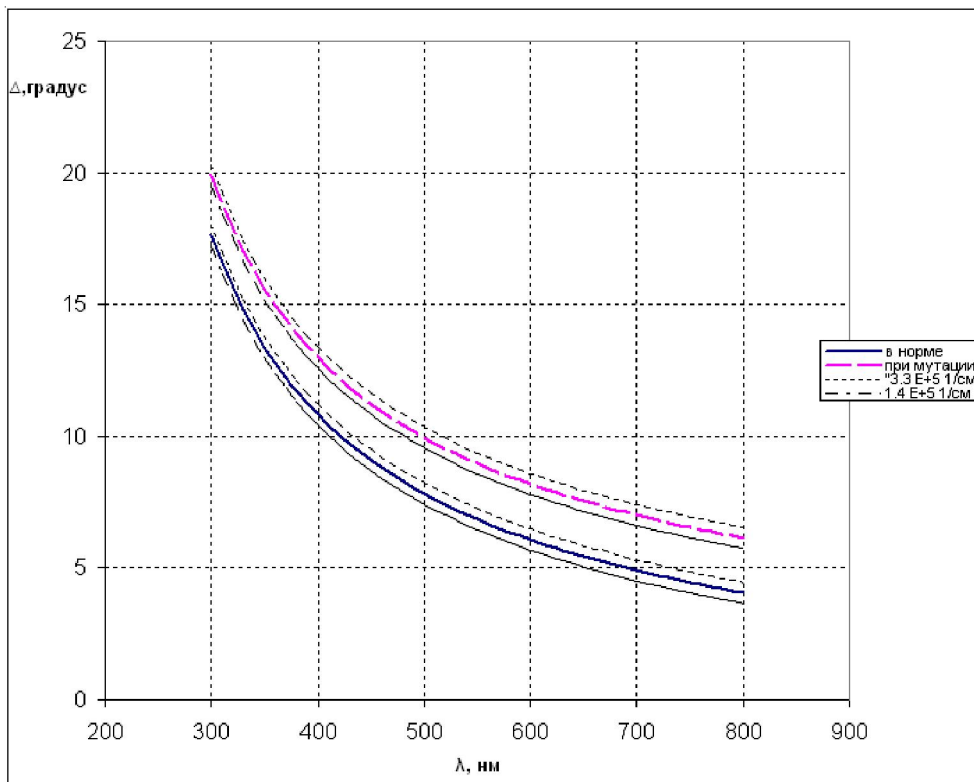


Рис. 4. Расчетная зависимость эллипсометрического угла от длины волны

В видимом диапазоне наблюдается затухание эллипсометрических углов ψ и Δ , что характерно для биомолекул.

Из рисунков 3 и 4 видно, что эллипсометрические параметры для молекулы коллагена в норме и при патологии существенно различаются. Так, например, для длины волны $\lambda = 633$ нм $\delta\psi = 0.003^\circ$, $\delta\Delta = 2.1^\circ$. Полученные результаты приводят к такому выводу, что эллипсометрия является чувствительным методом к незначительным изменениям в структуре коллагена, что позволяет данный метод использовать для диагностики заболеваний.

В настоящее время воспроизводимость эллипсометров, используемых в Лаборатории эллипсометрии полупроводниковых материалов и структур ИФП СО РАН, составляет $\delta\psi = 0.003^\circ$; $\delta\Delta = 0.005^\circ$ для быстродействующего лазерного эллипсометра ЛЭФ-752 с источником света He-Ne – лазера, а для спектрального эллипсометрического комплекса – $\delta\psi = 0.02^\circ$ и $\delta\Delta = 0.05^\circ$ (источник света – ксеноновая лампа высокого давления) [1].

Заключение:

1. В ходе проведенного в работе исследования объекта (молекулы коллагена IV типа) была применена кластерная модель, в результате чего молекула была представлена в совокупности кластеров (420 кластеров).

2. Содержание в кластере определенных аминокислот (Arg, Lys, Asp, Glu, His) приводит к изменению характера зависимости силы вращения от длины волны, а именно к разделению вклада в оптическое вращение по различным областям спектра.

3. Наблюдается существенное отличие значений эллипсометрических параметров мутированного коллагена и коллагена в норме. Так, для длины волны $\lambda = 633$ нм $\delta\psi = 0.003^\circ$, $\delta\Delta = 2.1^\circ$.

4. Проведенные исследования показывают, что метод эллипсометрии является чувствительным и позволяет отслеживать такие незначительные изменения в структуре молекулы коллагена, как точечные мутации (на примере синдрома Альпорта).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аззам, Р. Эллипсометрия и поляризованный свет / Р. Аззам, Н. Башара. – М. : Мир, 1981. – 583 с.
2. Горшков, М. М. Эллипсометрия / М. М. Горшков. – М. : Советское радио, 1974. – 200 с.
3. Игнатова, М. С. Наследственный нефрит (синдром Альпорта) / М. С. Игнатова, Ф. Д. Цаликова. – М. : Медицина, 2000.
4. Кизель, В. А. Гиротропия кристаллов / В. А. Кизель, В. И. Бурков. – М. : Наука : Гл. ред. физ.-мат. лит., 1980. – 304 с.
5. Никитин, В. Н. Возрастная и эволюционная биохимия коллагеновых структур / В. Н. Никитин, Е. Э. Перский, Л. А. Утевская. – Киев : Наукова Думка, 1977. – 242 с.
6. Потапенко, А. Я. Действие света на человека и животных / А. Я. Потапенко // Соросовский образовательный журнал. – 1996. – № 10. – С. 13–21.
7. Юрина, Н. А. Гистология : учебник / Н. А. Юрина, Е. Ф. Котовский [и др.] ; под ред. Ю. И. Афанасьева, Н. А. Юриной. – 5- изд., перераб. и доп. – М. : Медицина, 2001. – 744 с.
8. Bornstein, P. The Biosynthesis of Collagen / P. Bornstein // Ann Rev Biochem. – 1974. – V. 43. – P. 567–603.
9. Ruud, K. Optical rotation studied by density-functional and coupled-cluster methods / K. Ruud, T. Helgaker // Chem. Phys. Lett. – 2002. – Vol. 352. – P. 533–539.
10. Stephens, P. J. Determination of Absolute Configuration Using Optical Rotation Calculated Using Density Functional Theory / P. J. Stephens, F. J. Devlin, J. R. Cheeseman, M. J. Frisch, C. Rosini // Org. Lett. – 2002. – Vol. 4, № 26. – P. 4595–4598.