

О.В. Градов

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ УСТАНОВКИ ДЛЯ ОЗОНОМЕТРИЧЕСКОЙ МИКРОСКОПИИ

### Аннотация

Предложен новый метод микроскопии, позволяющий измерять уровень свободных радикалов, активных форм кислорода и радиомиметиков, вырабатываемых в клетке при окислении или под действием излучения в корреляции с индуцирующими их выработку факторами – озоном и ультрафиолетовым облучением. Предложенный метод позволяет проводить измерения в различных спектральных диапазонах и сопоставлять физиологическое воздействие данных агентов морфологическим изменениям гистологических структур, в том числе в динамике – при мониторинге и длительных экспериментах.

Люминесцентная микроскопия, ультрафиолетовая микроскопия, ультрамикроскопия немислимы без использования высокомоощных источников излучения – газоразрядных ртутных ламп, в том числе ламп высокого давления, являющихся высокоэффективными «генераторами» озона (то же самое характерно и для эксимерных ламп). Между тем, озон при микроскопии биологических объектов представляет угрозу для культур тканей, имея токсико-химическое взаимодействие с последними на молекулярном уровне [1]. Работы, рассматривающие вопросы физиологической опасности озона [2]-[5], основаны на представлениях о воздействии озона, продуцируемого ультрафиолетовым облучением [6]. С другой стороны, озон может рассматриваться как низкомолекулярный фармацевтический агент [7], характеризующийся высокой эффективностью неспецифического воздействия на ткани, что не в меньшей степени, чем вышеупомянутый токсический эффект, может являться источником морфофизиологических артефактов при наблюдениях культур тканей *in vitro*. Достаточно отметить, что биоцидное действие ультрафиолетового излучения базируется во многих методах не на прямом облучении объектов и сред, а на воздействии озона на последние [8]-[10]. Это требует создания методов и установок для дозиметрии и озониметрии при микроскопических манипуляциях с тканями [11]. Данное требование согласуется с предписаниями международных и национальных организаций медико-экологического профиля, требующих учета проблемы озона как на глобальном, так и на локальном уровнях [12], [13], так как, помимо исследуемых тканей, озон воспринимается также и человеком – оператором микроскопии, что особо нежелательно при работе в режиме мониторинга в ходе длительных экспериментов.

### Конструкция установок

Для решения этой проблемы были разработаны две установки для озониметрической ультрафиолетовой и озониметрической люминесцентной микроскопии при ультрафиолетовом возбуждении. Обе установки включали в себя анализатор озона, с помощью шлангов подсоединенный к микроскопическому блоку,

на оптической части которого был зафиксирован измеритель параметров излучения, и ЭВМ, на которую подавались сигналы анализатора озона и других взаимодействующих с установкой измерительных устройств.

Результатом измерений является сопоставление динамики энергетической освещенности, концентрации озона и формы морфологической реакции клеток или тканей на внешнее воздействие ультрафиолетовым облучением и озоном с возможностью разделения результатов влияния того и другого. Ниже описываются два варианта монтажа установки, непосредственно апробированные автором.

*Ультрафиолетовая озониметрическая микроскопия.* В качестве микроскопического шасси использовали «Биолам-70» с кварцево-линзовым конденсором для пропускания в ультрафиолетовой области. Микроскоп устанавливали на корпус бактерицидного облучателя, в качестве источников излучения которого использовали две лампы ДРБ-8 мощностью 8 Вт с характеристической длиной волны 253,7 нм или лампы Вуда, тип «Philips TL8W/08», мощностью в диапазоне UV-A 1,3 Вт и отношением UV-B/UV-A 1:4 при длинах волн 350...380 нм. Для измерения энергетической освещенности использовали спектрально-селективный УФ-радиометр ТКА-ПКМ 12 (ТКА-АВС) и люксметр-УФ-радиометр ТКА-ПКМ 06. Использовались полупроводниковые твердотельные детекторы излучения штатного типа, обладающие спектральной чувствительностью (рис. 1а, б) для первого и второго типов приборов соответственно. В качестве анализатора озона использовали измеритель массовых концентраций озона «Циклон-5», ЗАО «Оптэк» (рис. 2). Сигнал анализатора выводился через интерфейс RS-232 на ЭВМ, а также через выходы для подключения самопишущих приборов на мультиметры серии М-83 (М-830, DVM-830, М-832, DVM-831). Полученные данные регистрировались после замены тринокулярной насадки на оптически-модернизированный аппарат типа PA-7 камерой «CANON 590 IS» под управлением процессора «DIGIC III» с возможностью наблюдения спектральной RGB-гистограммы в режиме реального времени. Внешний вид этого варианта

установки в сборе приведен на *рис. 3*. Данная установка может работать как люминесцентный озонометрический анализатор при использовании вместо ДРБ-8 (UV-C) ламп TL8 (UV-A), вызывающих флуоресценцию.

*Люминесцентная озонометрическая микроскопия.*

Были изготовлены два варианта установки на базе микроскопов «Люам» и МЛ-2. Стандартная схема системы с опущенными системами подкачки и регистрирующей камерой представлена на *рис. 4*. Она включает в себя те же блоки, что и установка ультрафиолетовой микроскопии. Однако при этом изменяются база и тубус микроскопа, что позволяет провести измерительные коммуникации и воздушные шланги в основе аппарата. Функцию из-

мерителя уровня аналогового сигнала выполняет не мультиметр, а самописец или осциллограф. Кроме того, можно ввести две точки измерения характеристик ультрафиолетового излучения – непосредственно в корпусе «генератора» или над его поверхностью и в точке выхода пучка на препарат, что позволит сравнить действие излучения на персонал и на препарат.

Следует отметить, что хотя люминесценция возбуждается одним диапазоном длин волн, спектр стандартной ртутной лампы, используемой в качестве излучателя в люминесцентных микроскопах, содержит большее количество линий в ультрафиолетовом диапазоне. Аналогичным образом обстоит дело с применением в качестве ультрафиолето-



Рис. 1а. Относительная спектральная чувствительность ТКА-АВС в трех диапазонах С, В и А, отмеченных на *рисунке* соответствующими литерами

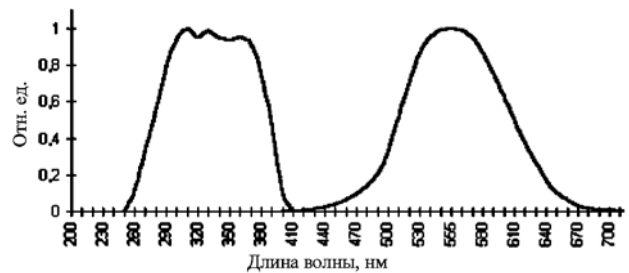


Рис. 1б. Относительная спектральная чувствительность ТКА-ПКМ 6

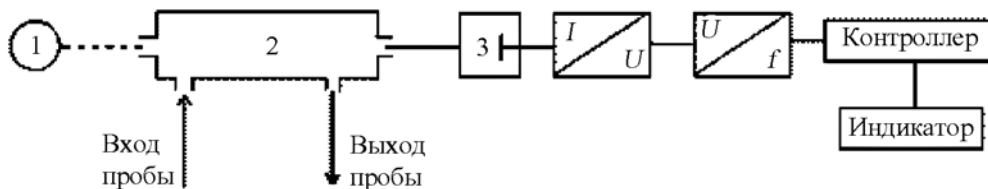


Рис. 2. Блок-схема газоанализатора: 1 – ртутная лампа; 2 – оптическая кювета; 3 – фотоприемник



Рис. 3. Внешний вид установки озонометрической УФ-микроскопии

вых источников ксеноновых и дейтериевых ламп, а также ксенон-хлорных ламп. Поэтому целесообразно использовать детекторы для различных спектральных областей при фиксации энергетической освещенности в разных частях оптического тракта установки. Это необходимо, в частности, для того, чтобы при пересчете энергетической освещенности на площадь микропрепарата представлять удельное воздействие на него излучений, влияющих на разные области, или компартменты, клеток. В описанной выше установке для люминесцентной озонометрической микроскопии использовались датчики ТКА-АВС, обладающие чувствительностью в диапазонах UVA и UVB 10...60000 мВт/м<sup>2</sup> и в диапазоне UVC 1,0...20000 мВт/м<sup>2</sup> по стандарту ISO-DIS-21348.

### Синхронное картирование и его результаты

Эксперимент по сравнительному картированию повреждений и зон биохимической чувствительности может быть организован следующим образом. Визуализируя трехмерные профили яркости по наиболее близкому к УФ коротковолновому спектральному каналу (В) с помощью программы «Ortimas» (v. 6.1) при непосредственном контроле чистоты спектрально-анализирующей фильтрации с использованием вектроскопа, можно получить профилирование трансмиттанса (пропускания) клетки, а следовательно – области относительной резистентности к повреждениям (рис. 5). Области локальных минимумов соответствуют ядру и оболочке-

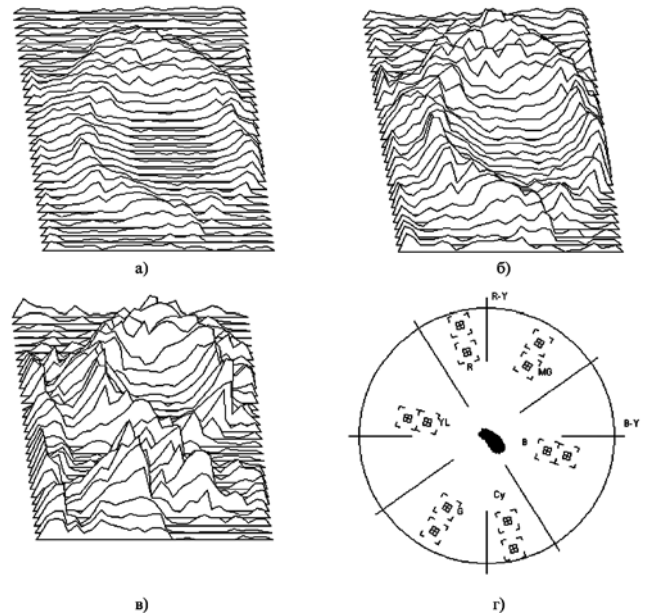


Рис. 5. Профилирование трансмиттанса (пропускания) обводненной цитоплазмы клетки на разных увеличениях (а)–(в) и спектрально-соответствующая им векторограмма (г)

мембране. Это позволяет предположить, что они нерезистентны к воздействию. В пользу такого предположения говорит наличие максимумов окисления (т. е. зон изменения редокс-статуса клетки), соответствующих локальным минимумам на рис. 5. На рис. 6а представлены результаты УФ-микроско-

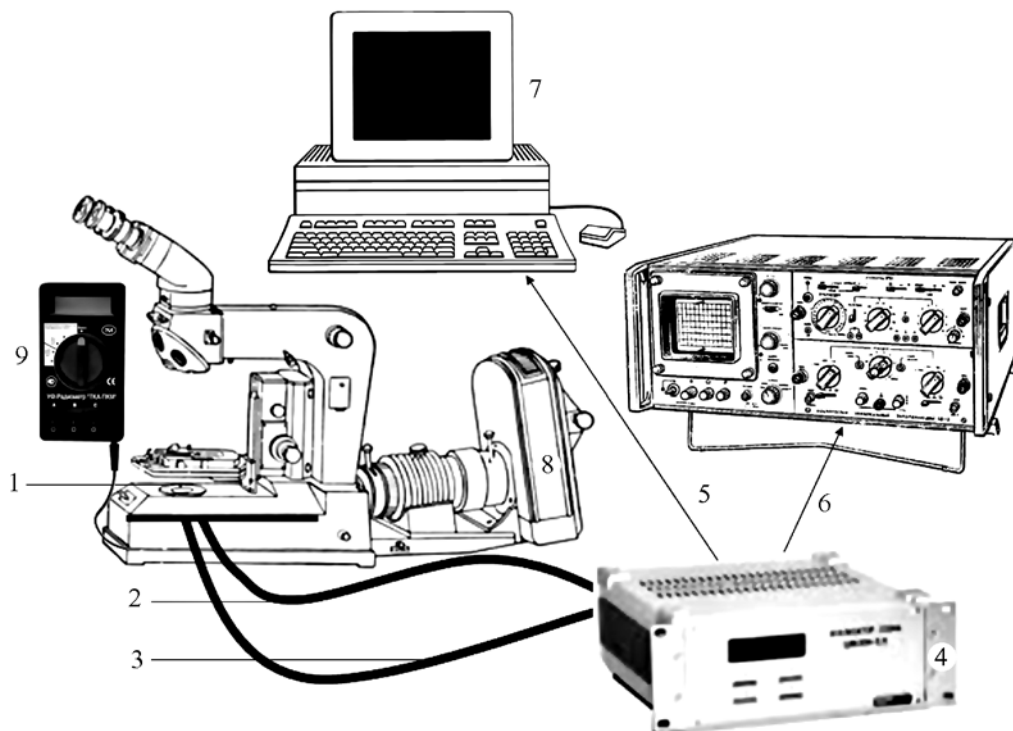


Рис. 4. Установка люминесцентной озонометрической микроскопии в процессе монтажа: 1 – апертура и кварцевое стекло; 2 и 3 – шланги; 4 – анализатор озона; 5 – шлейф RS-232; 6 – BNC-выход на осциллограф; 7 – ЭВМ; 8 – источник излучения; 9 – УФ-радиометр ТКА

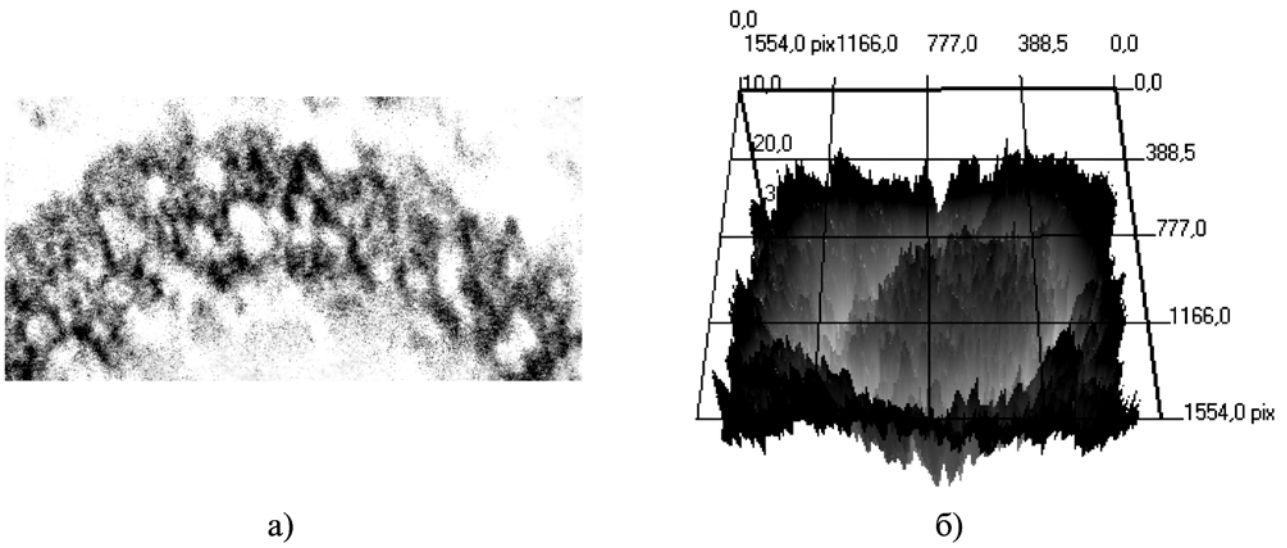


Рис. 6. Структурная и оптическая гетерогенность микроструктуры клетки как критерий редокс-картирования

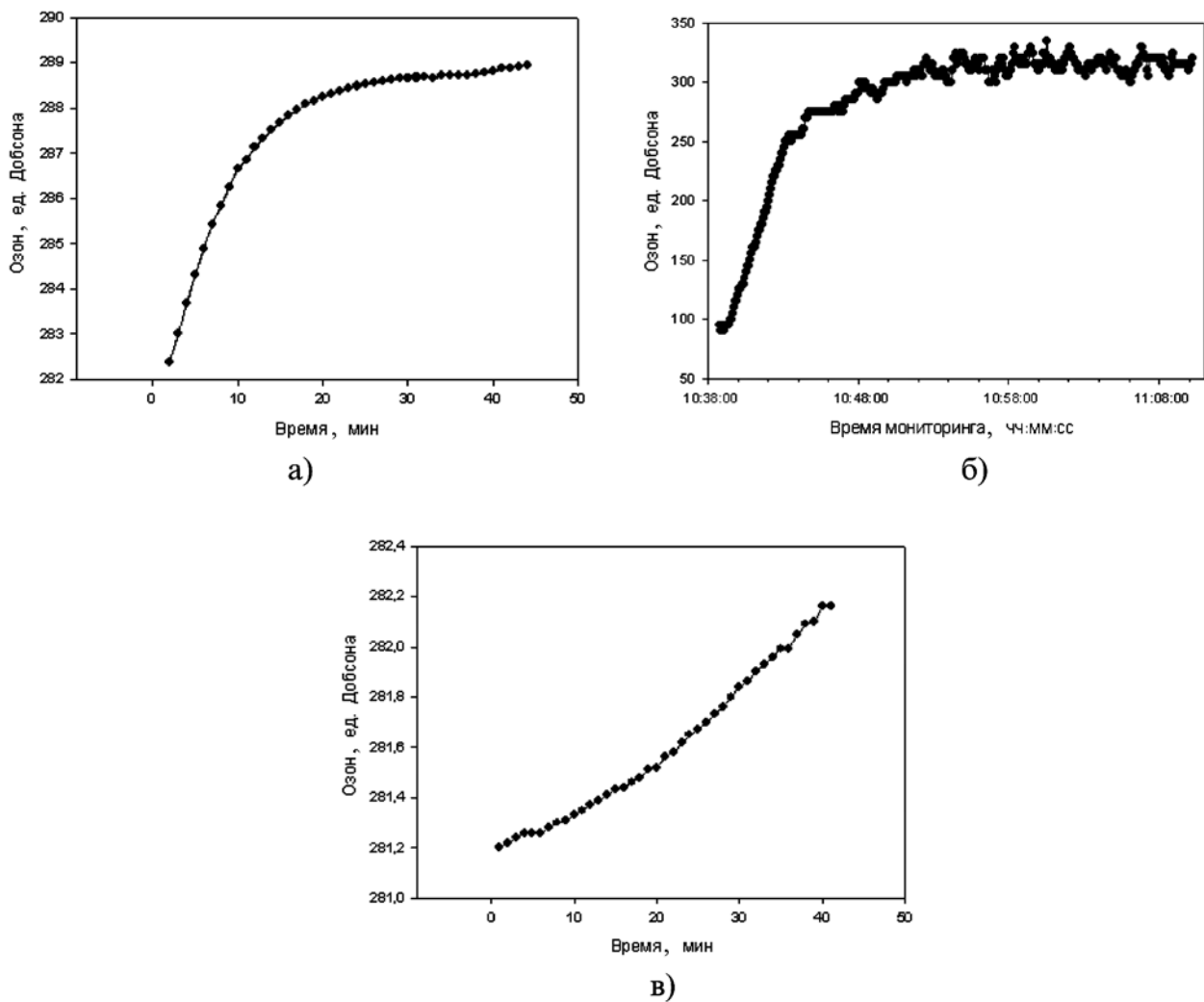


Рис. 7. Формы изменения концентрации озона в установке для ультрафиолетовой озонметрической микроскопии в норме (а) и при дефектах эксплуатации (б, в)

пии кортикального слоя цитоплазмы, указывающие на реактивное увеличение ее гранулярности, а на *рис. 6б* представлена фотометрическая абсорбционная структура данной клетки, согласно которой ядро и мембранная оболочка с кортикальным слоем являются наиболее флуктуирующими по экстинкции, а следовательно, наиболее гранулированными и гетерогенными по редокс-компартиментализации зонами, из чего следует, что тезис о коммутативности УФ-трансмиссионной и редокс-карт верен, что логично, так как действие УФ-излучения и озона как радиомиметика должны коррелировать между собой.

### Регистрация кинетических режимов

Известно, что биологическое действие озона прямо связано с его концентрацией в среде. С позиций градиентных измерений важным является не только сама концентрация, но и кинетика ее изменения, т. е. характеристика скорости увеличения концентрации в пространстве–времени. По достижении определенной стандартной величины концентрации  $O_3$  он образует стационарно-поддерживающийся слой. Индексировать его наличие можно, используя единицы Добсона при измерениях концентрации озона. Единица Добсона соответствует слою озона в 10 мкм при стандартных температуре и давлении, что соответствует  $2,69 \cdot 10^{16}$  атомов озона на  $1 \text{ см}^2$  поверхности ( $0,447 \text{ ммоль/м}^2$ ). Следует помнить, что измерения в единицах Добсона привязаны к стандартизированным условиям температуры и давления (STP), вследствие чего, при наличии прокачки в схеме озонметрической микроскопии, не следует забывать о необходимости привязки результатов измерений к скорости прокачки. От этого не будет изменяться кинетика, но может варьировать абсолютное содержание в единицах Добсона.

Рассмотрим кинетику нарастания концентрации озона в установке ультрафиолетовой озонметрической микроскопии с прокачкой, представленной на *рис. 3*. При достаточно малом объеме облучателя происходит быстрое насыщение его внутреннего пространства озоном, что позволяет проводить калибровочные кинетические измерения в экспресс-режиме. В различных режимах прокачки и при различной кондиции ультрафиолетовых источников кинетика будет меняться; на *рис. 7а* показана кривая для нормальных STP-условий. Эта кривая характеризуется на начальном этапе высокой скоростью синтеза озона – 0,6 ед. Добсона/мин, а относительно равновесное состояние синтеза–диссоциации достигается между 288 и 289 ед. Вместе с тем, если лампа работает нестабильно, мерцает, а прокачка поддерживает давление, отличное от стандартного, то при сохранении формы кинетической кривой абсолютное значение озоновой концентрации и ее стабильность при выходе на стационар существенно меняются (*рис. 7б*). При исходно заниженном содержании озона до 100 ед. Добсона в вакуумированных исходных условиях с подкачкой баллонного газа рост концентрации идет с другой

кинетикой (до 27 ед./мин), но кривая имеет тот же характер. Начиная с 270 ед. Добсона, при тренде выхода на стационар регистрируются колебания концентрации озона, обусловленные интенсивной работой прокачки и попеременным отключением ламп излучателя. Описанный эксперимент демонстрирует возможные изменения кинетики при дефектах установки или же неправильно выставленных режимах обслуживающего оборудования. На *рис. 7в* представлены результаты измерений при отключении прокачки и малом диаметре отводящих озон патрубков: концентрация растет медленно (скорость нарастания концентрации снижена до 1 ед. за 40 мин) и линейно, из чего следует, что озон практически не проходит в регистрирующую часть газоанализатора.

Также на регистрацию кинетики могут существенно влиять характеристики используемого в установке стекла. Стекло следует подбирать не по отсутствию полос поглощения только в бактерицидном диапазоне UVC, а по полному спектру, включая спектральные области возбуждения люминесценции. Это зависит от модели микроскопа, на базе которого монтируется установка озонметрической микроскопии.

### Обсуждение

Корреляционная озонметрическая микроскопия представляет собой метод, позволяющий сопоставлять ультрафиолетовую восприимчивость, редокс-статус сред, окисляемых с изменением экстинкции, и потенциально влияющую на биологические образцы активность озона в среде. Этот метод может найти применение в цитохимических и гистохимических методах, связанных с использованием ультрафиолетового излучения, в том числе в:

- флуоресцентной визуализации генетического материала в оптической микроскопии;
- селективном флуоресцентном маркировании клеток;
- наблюдении и измерении автофлуоресценции;
- конфокальной флуоресцентной микроскопии и фемтосекундной биофотоники на коротковолновых ультрафиолетовых лазерах;
- стандартизации и сертификации протоколов рутинной флуоресцентной микроскопии;
- флуоресцентном иммуноанализе и флуоресцентном маркировании антигенов;
- биомембранологии и многих других.

В силу конструктивной простоты описанных схем разработка, монтаж и отладка озонметрических микроаналитических установок на базе имеющихся микромеханических и окулярных компонентов микроскопов при кардинально изменяемой оптической схеме могут быть под силу неспециалисту в области оптики. Из этого следует конструктивная гибкость описанной системы, а следовательно – возможность адаптации ее под нужды пользователя в биологической лаборатории.

*Автор выносит благодарность зам. зав. лабораторией фотобионики ИХФ РАН А.В. Лобанову, где была начата работа в описанном в статье направ-*

лении, а также заведующей лабораторией нейронной структуры мозга ФГБУ НЦН РАМН Л.А. Бережной, позволившей длительное время заниматься представленной в статье проблематикой в отрыве от рутинных изысканий, входящих в план лаборатории. Автор благодарит также студентов, участвовавших в тестировании системы и ее целевой доработке при получении первичных кинетических кривых.

*Список литературы:*

1. Goldstein B.D. The biochemical toxicology of ozone. – American Petroleum Institute, 1977. 290 p.
2. Reagan P.L. Hazards of ozone to human health. – Clear Air-Clear Water Unlimited, 1981. 97 p.
3. McKee D. Tropospheric Ozone: Human Health and Agricultural Impacts. – CRC Press, 1993. 352 p.
4. Miller M. Fundamentals of Extrapolation Modeling of Inhaled Toxicants: Ozone and Nitrogen Dioxide. – CRC Press, 1984. 303 p.
5. Adams W.C. Ozone toxicity effects consequent to prolonged, high intensity exercise in trained endurance athletes: Final report (Submitted in fulfillment of ARB contract AO-078-32; 31.08.1982). – University of California, Davis. Human Performance Laboratory, California. Air Resources Board, 1982. 53 p.
6. Hessen D.O. UV Radiation and Arctic Ecosystems. – Springer, 2002. 341 p.
7. Bocci V. Ozone: A New Medical Drug. – Springer, 2010. 322 p.
8. Ozone in Food Processing / Ed. by C. O'Donnell, B.K. Tiwari, P.J. Cullen, R.G. Rice. – Wiley-Blackwell, 2012. 312 p.
9. Oxygen/Nitrogen Radicals: Cell Injury and Disease. Ed. by V. Vallyathan, V. Castranova, X. Shi. – Springer, 2002. 420 p.
10. Ozone in Water Treatment. Application and Engineering. Ed. by B. Langlais, D.A. Reckhow, D.R. Brank. – Lewis Publishers, 1991. 569 p.
11. Overton J.H., Miller F.J. Dosimetry modeling of inhaled toxic reactive gases. In: Air Pollution, the Automobile, and Public Health. – National Academic Press, 1988. PP. 367-386.
12. Estimating Mortality Risk Reduction and Economic Benefits from Controlling Ozone Air Pollution, Committee on Estimating Mortality Risk Reduction Benefits from Decreasing Tropospheric Ozone Exposure & Board on Environmental Studies and Toxicology. National Research Council (U.S.). – National Academic Press, 2008. 220 p.
13. Ultraviolet Radiation: An Authoritative Scientific Review of Environmental and Health Effects of UV, with Reference to Global Ozone Layer Depletion. United Nations Environment Programme, World Health Organization, 1994. 352 p.

*Олег Валерьевич Градов,  
мл. научный сотрудник,  
лаборатория нейронной  
структуры мозга ФГБУ НЦН РАМН,  
г. Москва,  
e-mail: o.v.gradov@gmail.com*

**ВНИМАНИЮ ПОДПИСЧИКОВ,  
РУКОВОДИТЕЛЕЙ СЛУЖБ ИНФОРМАЦИИ И БИБЛИОТЕК!**

**ПРЕДЛАГАЕМ ПОДПИСАТЬСЯ НА ЖУРНАЛ  
«МЕДИЦИНСКАЯ ТЕХНИКА»**

**НА 2013 ГОД.**

**Индекс по каталогу «Роспечать» – 72940.**

**В редакции можно оформить и оплатить льготную подписку с любого месяца.  
Стоимость подписки (включая доставку и НДС 10 %): 750 руб. – за один номер,  
2250 руб. – на первое полугодие 2013 года (3 номера), 4500 руб. – на 2013 год (6 номеров).**

**Наши тел.: (495) 695-10-70, 695-10-71.**