

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ**

**ДВНЗ «УЖГОРОДСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ»**

**МЕТОДИ МЕДИКО-БІОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ**

**НАВЧАЛЬНИЙ ПОСІБНИК**

**Ужгоро- 2022**

**УДК 539.1**

**Навчально-методичний посібник** із загального курсу "**Методи медико-біологічних досліджень**" призначений для студентів фізичного факультету спеціальності «Біомедична інженерія», а також буде корисним для студентів біологів та медиків.

Посібник містить загальну характеристику і перелік сучасних методів та апаратури медико-біофізичних досліджень. У теоретичних відомостях до відповідних лабораторних робіт коротко описана фізична суть основних методів та особливості їх застосування для вивчення біомедичних об'єктів.

**Автори:**

*доцент Суховія М.І., професор Шафраньош І.І.,*

*доцент Шафраньош М.І.*

**Рецензенти:**

*доцент Маргітич М.О., доцент Конопльов О.М.*

## З М І С Т

<b>I. ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТОДІВ МЕДИКО-БІОФІЗИЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ</b>	4
<b>II. ЛІТЕРАТУРА</b>	8
<b>III. ЛАБОРАТОРНІ РОБОТИ</b>	11
1. Математичне моделювання біомедичних процесів	11
2. Вивчення спектрів поглинання біомолекул	20
3. Флуоресцентна спектроскопія біомедичних об'єктів	27
4. Дослідження електричних властивостей біосистем	33
5. Мас-спектрометрія біооб'єктів	39
6. Електронна мікроскопія біоматеріалів	44
7. Вивчення спектральних характеристик слуху людини. Аудіометрія	49

# **I. ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТОДІВ МЕДИКО-БІОФІЗИЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ**

*Прямі методи:*

## **1. РЕНТГЕНОСТРУКТУРНИЙ АНАЛІЗ.**

Рентгенівська структурна кристалографія білків, нуклеїнових кислот, вірусів, клітин. Дослідження фібрилярних структур і тканин за допомогою дифракції рентгенівських променів. Використання синхротронного випромінювання для структурних досліджень.

## **2. МІКРОСКОПІЯ.**

Особливості електронної мікроскопії білків, нуклеїнових кислот, вірусів, клітин і тканин. Скануюча мікроскопія. Дослідження ультратонких зрізів клітин і тканин. Лазерний проекційний мікроскоп. Лазерний електронний мікроскоп. Люмінесцентна мікроскопія.

## **3. МЕТОДИ МЕДИЧНОЇ ВІЗУАЛІЗАЦІЇ**

**Рентгенологічні:** Комп'ютерна томографія (КТ), Контрастна рентгенографія, Лінійна томографія, Рентгенографія, Томосинтез, Флюорографія, Рентгеноскопія.

**Магнітно-резонансні:** МР-томографія (МРТ), Функціональна МР-томографія (фМРТ), МР-спектроскопія, МР-ангіографія.

**Радіонуклідні:** Однофотонна емісійна комп'ютерна томографія (ОФЕКТ), Позитронно-емісійна томографія (ПЕТ)

**Оптичні (Лазерні):** Оптична когерентна томографія. Комп'ютерна томографічна лазерна маммографія. Оптична томографія. Оптична топографія.

Ультразвукові: УЗ-діагностика органів. Ехоенцефалоскопія. Ехокардіографія. Доплерографія.

#### **4. МОДЕЛЮВАННЯ МЕДИКО-БІОЛОГІЧНИХ СИСТЕМ.**

Загальні принципи побудови моделей медико-біологічних систем і явищ. Модель динаміки росту нелімітованої системи (ракової пухлини, вірусної інфекції тощо). Модель популяції в умовах обмеженості ресурсів. Модель "хижак-жертва" для медико-біологічних взаємодій. Модель процесів передачі інформації у нервовій системі. Моделювання фотосинтетичного електронного ланцюга. Комп'ютерне моделювання побудови складних біосистем із підсистем (модель синтезу ДНК та білків із мономерів; побудова клітини із біомолекул, організму з клітин). Оцінка зміни ентропії та інформації при побудові складних біосистем із компонентів та при фазових переходах.

#### **5. МАС-СПЕКТРОМЕТРІЯ**

Елементний та молекулярний якісний та кількісний аналізи біомедичних об'єктів методом мас-спектрометрії. Мас-спектрометрична ідентифікація біологічно активних сполук. Використання мас-спектрометрії в екології. Мас-спектрометрія в генній інженерії та біомедіцинженерії. Лазерний мас-спектрометр.

#### **6. МЕТОДИ ВИВЧЕННЯ ЕЛЕКТРИЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ**

Мікроелектродні методи вивчення іонної проникності біологічних мембран. Техніка вимірювання мембранних біопотенціалів. Застосування методу фіксації напруги. Метод внутріклітинного діалізу. Моношари біомолекул на межах розділу двох середовищ. Штучні мембрани. Електрофорез.

Діелектрометрія. Вивчення дисперсії електропровідності, імпедансу, діелектричної сталої біологічних об'єктів. Коефіцієнт поляризації. Діаграми

Коул-Коула. Методи визначення біопотенціалів спокою та дії живих клітин при впливі фізичних факторів довкілля.

Вивчення електричних характеристик людини. Електрокардіограма. Фонокардіограма. Реоплетизмограма. Сфігмограма.

## **7. ОПТИЧНІ МЕТОДИ І АПАРАТУРА ДЛЯ ДОСЛІДЖЕННЯ БІООБ'ЄКТІВ**

Спектральні методи вивчення стаціонарних властивостей біологічних систем. Абсорбційна спектрофотометрія. Флуоресцентна спектроскопія. Методи оптичної активності. Поляриметрія. Рефрактометрія. Спектральні методи вивчення динамічних характеристик біосистем. Диференціальна спектрофотометрія. Динамічна спектрофлуориметрія. Метод температурного стрибка. Кінетичні методи вивчення конформаційних переходів у біомакромолекулах. Флуоресцентні мітки і зонди для вивчення біосистем. Лазерна спектроскопія процесів зору, фотосинтезу та інших фотобіологічних процесів. Спектрометри комбінаційного розсіювання.

## **8. ГІДРОДИНАМІЧНІ МЕТОДИ.**

Віскозиметрія. Дифузометрія. Седиментаційний аналіз. Методики вимірювання швидкості осідання еритроцитів (ШОЕ). Загальний аналіз крові з диференційованим підрахунком лейкоцитів на автоматичному гематологічному аналізаторі та мікроскопією препаратів. Метод подвійного променезаломлення в потоці. Хроматографія. Сталагмометрія. Тониметрія. Рефрактометрія.

## **9. КАЛОРИМЕТРИЧНІ МЕТОДИ**

Метод ізотермічної мікрокалориметрії. Диференційна скануюча мікрокалориметрія. Термогравиметрія.

## **10. РАДІОІЗОТОПНИЙ МЕТОД.**

Використання радіоізотопів для вивчення структури і функцій біомедсистем - біомолекул, мембран, клітин і організмів. Радіоізотопи в медицині, біології, екології. Визначення радіаційного фону середовища. Дозиметрія.

## **11. МЕТОДИ І АПАРАТУРА РАДІОСПЕКТРОСКОПІЇ.**

Метод електронного парамагнітного резонансу. Ядерний магнітний резонанс. Дослідження біооб'єктів методом гамма-резонансної спектроскопії.

## **12. МЕТОДИ ВИЗНАЧЕННЯ ПОСЛІДОВНОСТІ МОНОМЕРІВ В БІОПОЛІМЕРАХ – СЕКВЕНУВАННЯ.**

Класичні методи і прийоми розшифровки послідовності амінокислот і нуклеотидів у макромолекулах білків, ДНК та РНК. Нові біофізичні методи секвенування і картування геному. Комп'ютерний аналіз генетичних послідовностей. Генетичне тестування. Електрофореграми ДНК і генетичний паспорт.

## **13. МЕТОДИ ПРИКЛАДНОЇ БІОФІЗИКИ**

Біоніка. Біомеделектроніка. Біосенсорика. Біомедінженерія. Біоінформатика. Біомедритмологія. Біонанотехнології.

## II. ЛІТЕРАТУРА

1. Костюк П.Г., Зима В.Л., Магура І.С., Мірошніченко М.С., Шуба М.Ф. Біофізика. - К.: Вища школа, 1989; Обереги, 2001. – 544 с.
2. Чалий О.В. та ін. Медична і біологічна фізика.–Вінниця: Нова Книга, 2013.–528 с.
3. Yu.I.Posudin. Measuring environmental parameters.- WILEY, 2014,- 428p.
4. Современные методы биофизических исследований, (под ред. А.Б. Рубина). - М.: Высшая школа, 1988. - 376 с.
5. Личковський Е.І. та ін. Біофізика. Фізичні методи аналізу та метрологія. – Вінниця.: Нова книга, 2014. – 464 с.
6. Посудін Ю.І. Біофізика і методи аналізу навколишнього середовища. – К.: Printline, 2013. – 354 с.
7. Малеев В.Я. Методы биофизических исследований. – Х.: ХНУ имени В. Н. Каразина, 2014. – 457с.
8. Ремизов А. Н. и др. Медицинская и биологическая физика. – М.: Дрофа, 2010. – 558 с.
9. Физические методы исследования белков и нуклеиновых кислот.(под ред. Лазуркина Ю.С.). - М.; Наука, 1987. – 324 с.
- 10..В.Л. Зима, В.И. Мирутенко, Т.Л. Давыдовская. Биофизические методы исследований.- К.: УМК ВО, 1990.- 250 с..
- 11.Васильченко О.А. Біохімія: лабораторний практикум.- К.: НАУ,2015– 92 с.
- 12.Тиманюк В. А., Животова Е. Н. Биофизика.– Х.: НФАУ, 2003. – 704 с.
- 13.Гродзинський Д.М. Радіобіологія. - К.: Либідь, 2001. - 448 с.
- 14.Yu.I.Posudin. Measuring environmental parameters.- WILEY, 2014. - 429 p.
15. Кучеренко М.Є. та ін. Біохімія. – К.: ВПЦ КНУ, 2002. – 480 с.
16. Шафраньош І.І., Суховія М.І., Шафраньош М.І. Фізичні поля і живі організми. - Ужгород: Вид. УжНУ, «Говерла», 2021. –213 с.
- 17.Чаварга М.М., Шафраньош І.І. Техніка лазерів. Фізичний практикум.



Навчальний посібник. Ужгород, 2021, 52 с

18. Эссаулова И.А. и др. Руководство к лабораторным работам по медицинской и биологической физике. – М.: Высш.шк., 1987. – 271 с.
19. Посудин В.Ю. Лазерная фотобиология. - К.: Вища школа, 1989.
20. Нолтинг Б. Новейшие методы исследования биосистем. – М.: Техносфера, 2005. – 256с.
21. Физика визуализации изображений в медицине. Т.1. - Под ред. С.Уэбба. – М.: Мир, 1991. – 407с.
22. Физика визуализации изображений в медицине. Т.2. - Под ред. С.Уэбба. – М.: Мир, 1991. – 406с.
23. Применение ультразвука в медицине: Физические основы - Под ред. К.Хилла. – М.: Мир, 1989. – 568 с.

### **Додаткова література**

1. Ємчик Л., Кміт Я. Медична біофізика. Львів: НТШ ім. Шевченка, 1998. = 250 с.
2. Губанов Н.И., Утепбергенов А.А. Медицинская биофизика. – М.: Медицина, 1987. – 398 с.
3. Рубин А. Б. Биофизика, в 2 т.– М.: Кн. дом Университет, 2000. – 917 с.
4. Гродзинський Д.М. Радіобіологія. - К.: Либідь, 2001. - 448 с.
5. Зима В.Л. Збірник задач з біофізики. – К.: Вища школа, 2001.- 124 с.
6. Владимиров Ю. А., Потапенко А. Я. Физико-химические основы фотобиологических процессов. – М. : Высш. шк., 1989. – 199 с.
7. B. F. Minaev, M. I. Shafranyosh, Yu. Yu Svida, M. I. Sukhoviya, I. I. Shafranyosh, G. V. Baryshnikov, and V. A. Minaeva. Fragmentation of the adenine and guanine molecules induced by electron collisions //J. Chem. Phys. 2014.- V. 140, p. 184303-184309.
8. I.I. Shafranyosh, M.I. Sukhoviya. Inelastic collisions of the uracil molecules with electrons //J. Chem. Phys. 2012.- V. 137, p. 184303-18430. .

9. Владимиров Ю.А. и др. Биофизика. - М.: Медицина, 1983.- 272 с.
10. Посудін Ю.І. Фізика з основами біофізики. - К.: Світ, 2003. – 399 с.

### **Інформаційні ресурси в мережі Інтернет**

1. Національна бібліотека України ім. В.І. Вернадського [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://www.nbuv.gov.ua>.
2. Український інститут інтелект <http://stud.com.ua>
3. Чурюмов Г.І. Фізичні моделі та інструментарій для 3-D візуалізації взаємодії низькоінтенсивного електромагнітного поля з мікро- та нанооб'єктами різної фізичної природи та біосередовищами ([https://openarchive.nure.ua > bitstream > document PDF](https://openarchive.nure.ua/bitstream/document/PDF)).
4. Остафійчук Д.І., Волощук В.В., Білобрицький Ю.А. Магнітне поле. магнітобіологія. магнітотерапія (огляд літератури).
5. Жорина Л.В., Змиевской Г.Н. Основы взаимодействия физических полей с биообъектами. Изд-во МГТУ им. Н. Э. Баумана, 2014. — 374 с. (<https://core.ac.uk/download/pdf/144960654.pdf>)
6. Інформаційний ресурс <http://ebooks.bmstu.ru/catalog/63/book1029.html>

### ІІІ. МАТЕМАТИЧНЕ МОДЕЛЮВАННЯ БІОМЕДИЧНИХ ПРОЦЕСІВ

#### ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 1

1. МЕТА РОБОТИ: Ознайомитись з основними принципами моделювання в біології і медицині, практично засвоїти математичні моделі нелінійних процесів в біосистемах.

#### 2. ТЕОРЕТИЧНІ ВІДОМОСТІ

Біологічні системи на всіх рівнях їх організації є надзвичайно складними структурно-функціональними одиницями. Щоб зрозуміти закономірності побудови і функціонування біосистем, часто необхідно їх спростити, формалізувати, виділивши важливі для даного конкретного дослідження властивості і характеристики, тобто створити модель біооб'єкту чи біопроцесу.

*Модель* - це умовний образ реального об'єкту, конструйований дослідником так, щоб відобразити саме ті властивості, структурні і функціональні параметри об'єкту, які є найбільш істотними для цілей дослідження.

У біології найчастіше використовуються такі моделі:

*Біологічні (предметні) моделі*, на яких вивчаються загальні закономірності. Приклади таких моделей - лабораторні тварини, культури клітин, фосфоліпідні мембрани тощо.

*Фізичні (аналогові) моделі*, тобто фізичні системи, які мають аналогічні з модельованим об'єктом властивості (наприклад, фізична модель системи кровообігу, модель легенів і т.д.)

*Математичні моделі* - це системи математичних виразів (формул, функцій, рівнянь), які описують ті чи інші властивості даного об'єкту, явища, процесу. Використання комп'ютерів різко розширило можливості і сферу дії математичного моделювання.

Математичне моделювання як метод дослідження має ряд переваг:

- 1) Точність і економність викладу кількісних закономірностей математичною мовою (графіками, формулами).
- 2) Перевірка гіпотез, сформульованих на основі експериментальних даних, може бути здійснена апробацією математичної моделі.
- 3) Математична модель дозволяє вивчати такі системи і в таких умовах, які важко відтворити в експерименті (наприклад, невагомість тощо).

Сучасна біофізика розглядає математичне моделювання як важливий і необхідний етап наукового дослідження.

## 2.1. МОДЕЛЬ ДИНАМІКИ БІОЛОГІЧНОЇ ПОПУЛЯЦІЇ

У конкретний момент часу чисельність особин у популяції залежить від їх народжуваності і смертності. Рівняння, яке описує динаміку популяції, можна записати в загальному виді:

$$\frac{dN}{dt} = B(N) - D(N)$$

або 
$$dN/dt = N[b(N) - d(N)], \quad (1)$$

де  $N$  - чисельність популяції в момент часу  $t$ ;

$B(N), D(N)$  - швидкість народження і загибелі особин;

$b(N) - d(N)$ , - питомі швидкості народження і загибелі, віднесені до загальної чисельності популяції (плодовитість і смертність).

Розв'язки даного рівняння для різних випадків показані на рис. 1.

Модель динаміки нелімітованої системи відображає, наприклад, ріст ракової пухлини, поширення вірусної інфекції тощо).

## 2.2. МОДЕЛЬ "ХИЖАК-ЖЕРТВА"

Динаміка взаємодії різних популяцій є складним *нелінійним* процесом, який реалізується в умовах, далеких від рівноваги. Математична модель взаємодії двох видів розроблена вченими Вольтерра і Лотка.

Припустимо, що в деякому замкненому районі живуть хижаки і їх жертви, наприклад, рисі і зайці. Рисі живляться лише зайцями, зайці споживають рослинну їжу, яка є в надлишку. Кількість жертв  $X$ , кількість хижаків  $Y$ . Поведінка популяцій в часі описується рівняннями:

$$\begin{aligned}\frac{dX}{dt} &= k_1X - k_2XY, \\ \frac{dY}{dt} &= k_2XY - k_3Y,\end{aligned}\quad (2)$$

де  $k_1$  – константа природного розмноження жертв;

$k_2$ -константа взаємодії хижак-жертва;

$k_3$ - константа природної смертності хижаків.

На рис. 2 приведені графіки функцій  $X(t)$ ,  $Y(t)$ . Видно, що  $X(t)$  і  $Y(t)$  є періодичними функціями часу, причому максимум чисельності жертв завжди випереджає максимум чисельності хижаків. Аналогічні закономірності будуть мати місце, наприклад, і при взаємодії віруса із клітиною тощо.

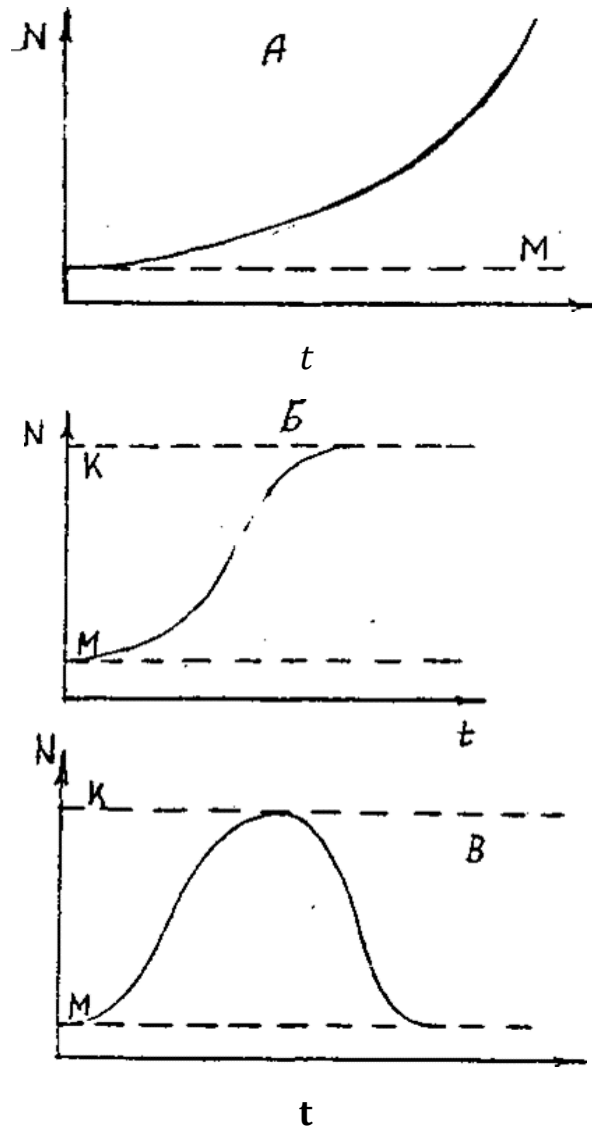


Рис. 1. Деякі види динаміки популяцій:

А – крива експоненціального росту;

Б – S-подібна (логістична ) крива;

В – експоненціальні ріст і спад чисельності ( $N$ );

М і К – нижня і верхня межі чисельності.

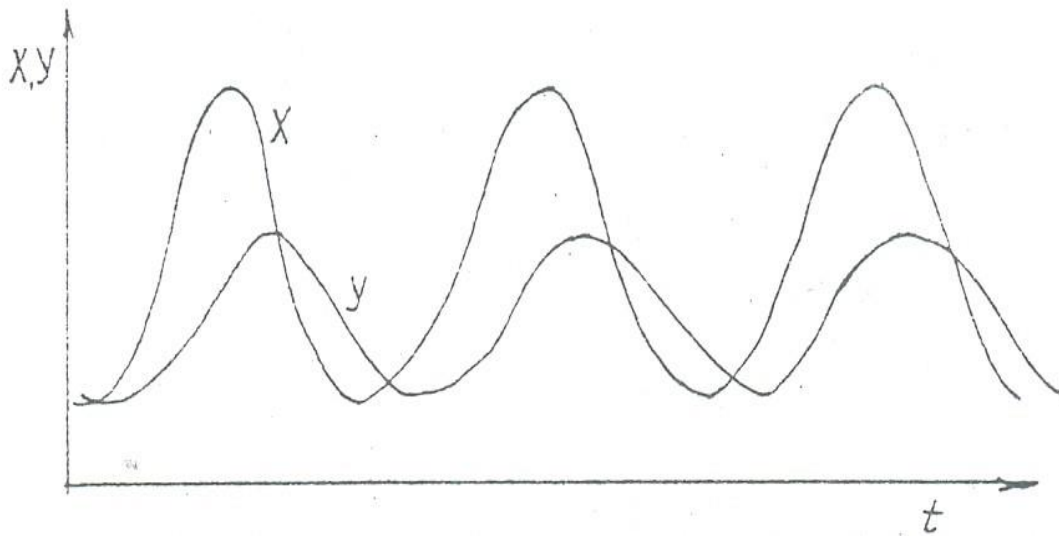


Рис.2. Теоретична залежність чисельності хижаків  $Y$  і жертв  $X$  від часу  $t$

### 2.3. ОЦІНКА ЗМІН ЕНТРОПІЇ ТА ІНФОРМАЦІЇ В БІОСИСТЕМАХ

Біологічні процеси супроводжуються істотними змінами ентропії та інформації. Оцінимо зміну цих параметрів для таких процесів:

- 1) побудова клітини із біополімерів;
- 2) синтез білків і нуклеїнових кислот із відповідних мономерів;
- 3) побудова багатоклітинного організму із клітин.

При цьому врахуємо, що організм дорослої людини містить біля 7 кг білків і 150г ДНК, що відповідає  $3 \cdot 10^{25}$  амінокислотних і  $3 \cdot 10^{23}$  нуклеотидних залишків. Кількість молекул біополімерів у клітині біля  $10^8$ . У тілі дорослої людини є  $10^{13}$  клітин. Всі  $N$  частинок є унікальними (вони різні, а їх відносне розміщення - своєрідне і ні одну пару не можна поміняти місцями). У такому разі термодинамічна імовірність  $W = N!$

Зміна кількості інформації  $\Delta I$ , яка відповідає даному біологічному процесу:

$$\Delta I = \log_2 W = \frac{\ln W}{\ln 2} = \frac{\ln(N!)}{\ln 2} \sim \frac{N \ln N}{\ln 2}. \quad (3)$$

## Зміна ентропії процесу

$$\Delta S = k \ln W = 2,3 \cdot 10^{-24} \cdot \Delta I, \quad (4)$$

де  $k$  – стала Больцмана.

За формулою

$$\Delta S = cm \ln \frac{T_2}{T_1}$$

знайти зміну ентропії при нагріванні 200 г води від 0 до 100°C (273 і 373°K). Порівняти всі отримані значення  $\Delta S$ . Зробити висновки про те, скільки "коштує" біологічна впорядкованість, якщо її оцінити за допомогою таких фізичних критеріїв.

Для математичного моделювання біомедичних процесів використовуються персональні комп'ютери. Виконання завдань 2.2. і 2.3. лабораторної роботи базується на спеціально розроблених програмах на мовах "BASIC" та "TURBO-PASCAL". Програми задають кілька типів моделей, які описуються рівняннями (1-4). Найменування програм: "MODEL", "MODEL 2", "LAB" та "VIRUS". На початку роботи рекомендується детально ознайомитись із особливостями виконання програм. Потім, задаючи різні вхідні параметри, виконати такі завдання: 1) Дослідити динаміку зміни чисельності нелімітованої системи при різних співвідношеннях народжуваності та смертності. 2) Проаналізувати динаміку популяції при наявності "змінного опору середовища". 3) Практично ознайомитись із моделлю взаємодії двох антагоністичних видів. 4) Дослідити систему "хижак-жертва-корм". 5) Виконати програму про взаємодію віруса із клітиною. У робочих зошитах зобразити динаміку змін



чисельності популяцій для всіх розглянутих моделей. Запрограмувати вирази (3) і (4) в діалоговому режимі. Зразок для білкових молекул:

```
PRINT ZE25*LOG(ZE25)/LOG(2)
```

За допомогою комп'ютера відтворити модель динаміки росту нелімітованої системи (наприклад, ракової пухлини, вірусної інфекції тощо). Дослідити модель «хижак – жертва» для медико-біологічних взаємодій.

## 2.4. МОДЕЛЮВАННЯ СТРУКТУРИ БІОМОЛЕКУЛ ЗА ДОПОМОГОЮ ПРОГРАМИ HyperChem

Моделювання структури біомолекул та визначення характеристик здійснюється за допомогою пакету програм HyperChem. Для проведення розрахунків структурних параметрів молекул був вибраний напівемпіричний метод AM1 з оптимізацією геометрії молекул. Така процедура дає енергетично вигідну просторову структуру молекули шляхом мінімізації енергії як за рахунок зміни просторового розташування атомів, так і завдяки конформаційних перетворень молекул. Основна мотивація вибору теоретично-розрахункового методу – доступність реалізації при прийнятній швидкості отримання інформації та її якості.

Основними характеристиками структури молекул є такі параметри:

- 1) розподіл електронних густин,
- 2) кути між зв'язками,
- 3) довжини зв'язків
- 4) порядки зв'язків.

Ці параметри є важливими для оцінки стабільності структури та реакційної здатності молекул і їх фрагментів. Енергія дисоціації прямо пропорційна порядку зв'язку, тобто чим менший порядок зв'язку, тим менша енергія дисоціації молекули, а значить більша хімічна активність.

Слід відмітити, що для реакційної здатності особливе значення має іонізація молекул, оскільки іонізовані молекули є часто хімічно активними. Тому, поряд із зарядово нейтральними молекулами, слід досліджувати і їхні іони - позитивні (катиони) і негативні (аніони).

На рисунках 3 -5 показані приклади застосування програми HyperChem для молекули тиміну.

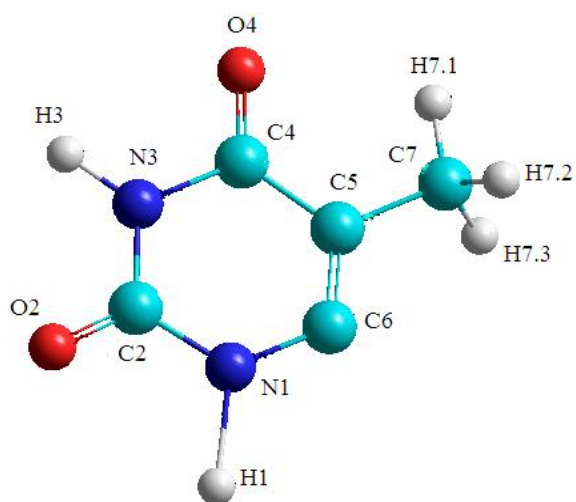


Рис.3. Молекула тиміну.

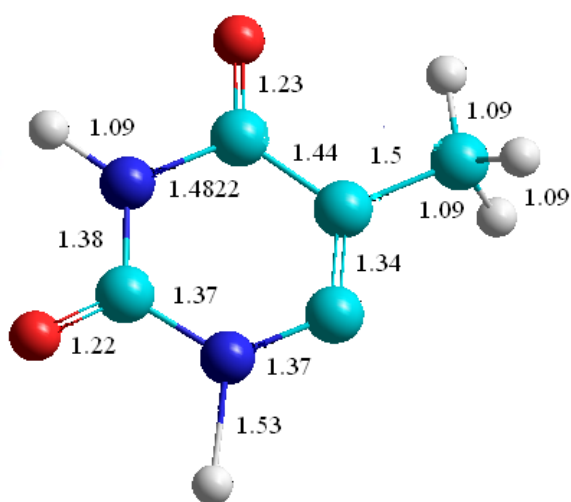


Рис.4. Довжини зв'язків у аніоні тиміну.

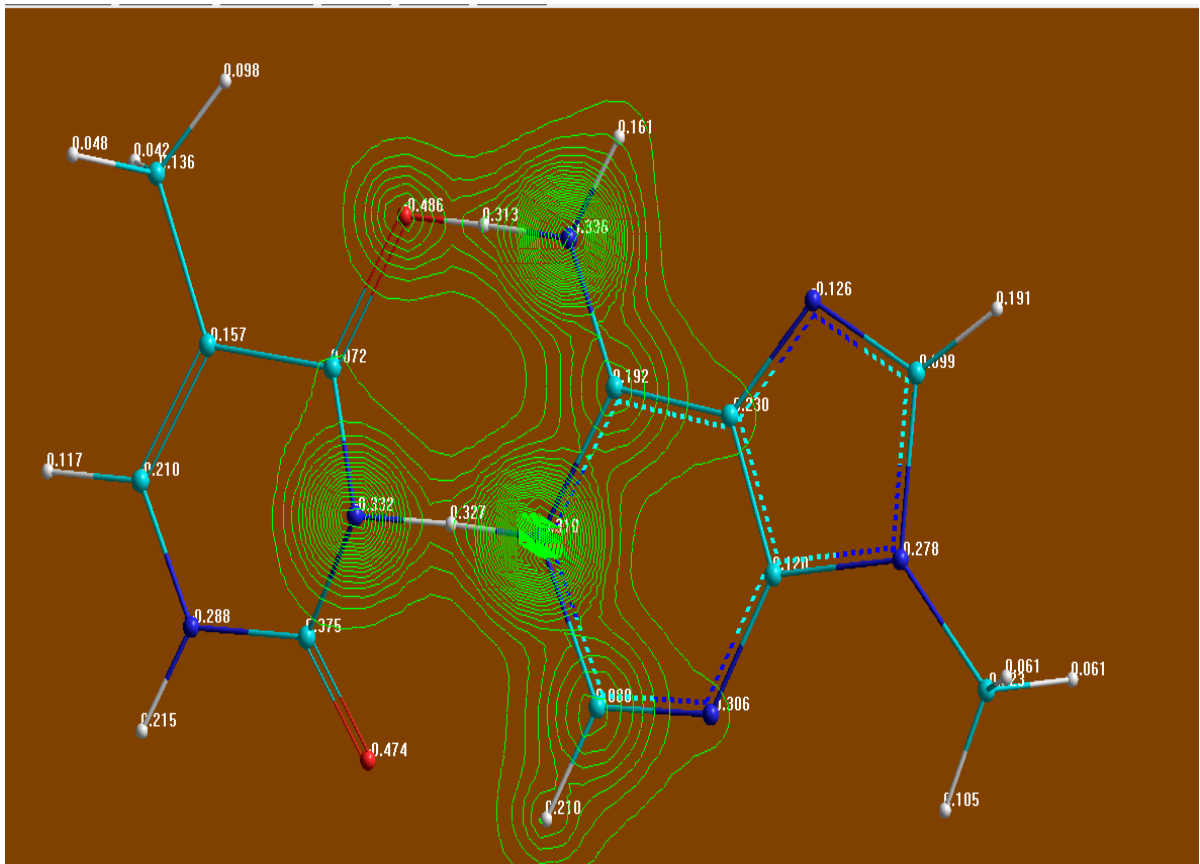


Рис.5. Розподіл електростатичного потенціалу в комплексі тимін-аденін

### 3. КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ

1. Що таке модель об'єкту?
2. Види моделей у біології і медицині.
3. Математичні моделі і їх переваги.
4. Приклади математичних моделей в біофізиці.
5. Зв'язок ентропії та інформації.
6. Особливості програми HyperChem.

## ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 2

### ВИВЧЕННЯ СПЕКТРІВ ПОГЛИНАННЯ БІОМОЛЕКУЛ

1. МЕТА РОБОТИ: Вивчити основні закономірності взаємодії квантів світла з молекулами біополімерів, практично ознайомитись із спектральними методами дослідження біооб'єктів.

#### 2. ТЕОРЕТИЧНІ ВІДОМОСТІ

Для вивчення фізичних і структурних особливостей біосистем використовуються різноманітні спектральні методи дослідження. Широкого застосування набули спектрофотометрія, флуоресцентний аналіз, дисперсія оптичної активності, лазерна спектроскопія, комбінаційне розсіювання.

*Спектри є джерелом інформації* про хімічну будову молекул, структуру їх енергетичних рівнів, про міжмолекулярну взаємодію, про конформації макромолекул та їх зміни при дії факторів зовнішнього середовища тощо. За допомогою спектральних вимірів проводиться якісний і кількісний аналіз біологічних зразків. Так, за виглядом спектру можна ідентифікувати молекулярний склад, а за інтенсивністю - визначити кількість молекул. Чутливість аналізу дуже висока - до  $10^{-6}$  % при незначній ( $10^{-6}$  г) масі досліджуваної речовини.

Залежно від частоти кванта (випромінюваного або поглиненого) розрізняють такі типи спектрів: радіоспектри, інфрачервоні, видимі, ультрафіолетові, рентгенівські, гама-спектри.

За *основним законом фотобіофізики*, який є наслідком закону збереження енергії, біологічну і хімічну дію може спричинити лише те світло, яке поглинається даною системою.

Під *поглинанням світла* (абсорбцією світла) розуміють зменшення інтенсивності світлової хвилі при проходженні через речовину внаслідок перетворення світлової енергії в інші види енергії.

При цьому важливі два фактори: 1) загальна кількість поглиненої енергії або кількість квантів, поглинених за одиницю часу; 2) величина кванту.

Спектрофотометрія базується на законі Бугера-Ламберта-Бера, який виводиться з таких міркувань. Нехай потік світлових квантів довжиною хвилі  $\lambda$ , проходячи через речовину, послаблюється внаслідок поглинання частини квантів молекулами.  $I$  - інтенсивність світлового потоку, тобто кількість квантів, які проходять через даний зразок за одиницю часу. Зменшення інтенсивності світла  $dI$  буде залежати від кількості зіткнень квантів з молекулами речовини. Кількість цих зіткнень пропорційна концентрації молекул  $C$  речовини, елементарній віддалі  $dl$  і інтенсивності світла  $I$ :

$$dI = -kICdl, \quad (1)$$

де  $k$  - коефіцієнт пропорційності. Після інтегрування отримаємо:

$$\ln \frac{I_0}{I} = kCl. \quad (2)$$

Звідси

$$I = I_0 e^{-kCl} \quad (3)$$

де  $e$  - основа натуральних логарифмів.

Рівняння (2) і (3) є *математичними виразами закону Бугера-Ламберта-Бера*:

Інтенсивність світлового потоку, який проходить через речовину, експоненціально зменшується в залежності від оптичного шляху і концентрації речовини.

Після заміни натуральних логарифмів на десяткові рівняння (2) матиме вигляд:

$$I g \frac{I_0}{I} = \varepsilon Cl, \quad (4)$$

де  $D$  -- оптична густина речовини;

$\varepsilon$  - молярний коефіцієнт поглинання, тобто оптична густина зразка товщиною 1 см при концентрації речовини 1 моль/л.

Отже, *оптична густина* зразка прямо пропорційна концентрації речовини і довжині оптичного шляху.

Відношення  $\frac{I}{I_0} = T$  називається *коефіцієнтом пропускання*.

Світло різних довжин хвиль поглинається в речовині по-різному. Залежність оптичної густини  $D$  від довжини світлової хвилі  $\lambda$  називається *спектром поглинання* речовини:  $D = D(\lambda)$ . Аналогічно залежність  $T = T(\lambda)$  є *спектром пропускання*.

Прилади, на яких вимірюють оптичну густина  $D$  або коефіцієнт пропускання  $T$  і записують відповідні спектри, називаються *спектрофотометрами*.

Метод дослідження фотобіологічних процесів за допомогою спектрів поглинання називається *абсорбційною спектрофотометрією*.

Молекули речовини поглинають кванти світла, енергія яких визначається за формулою Планка:

$$E = h\nu = h \frac{c}{\lambda}, \quad (5)$$

де  $\nu$  - частота світла;

$\lambda$  - довжина хвилі світлового кванта;

$c$  - швидкість світла у вакуумі ( $c = 2,9979 \cdot 10^8$  м с<sup>-1</sup>);

$h$ -стала Планка ( $h=6,63 \cdot 10^{-34}$  Дж-с<sup>-1</sup>).

Поглинені кванти збуджують електрони молекул і переводять їх із основного, незбудженого рівня  $S_0$  на більш високі збуджені синглетні рівні  $S_1$   $S_2$ , ... в залежності від енергії кванта. Збуджений стан молекули є нерівноважним. Час життя збудженого синглетного рівня становить  $10^{-8}$  –  $10^{-12}$  с. Імовірні такі шляхи подальшого перетворення поглиненої енергії: 1) тепла деградація; 2) висвічування кванту флуоресценції; 3) фотохімічні реакції; 4) міграція енергії на іншу молекулярну систему; 5) зміна напрямку спіна електрона і перехід у триплетний збуджений стан  $T_1$ . Триплетний стан є метастабільним, з часом життя від  $10^{-7}$  с до кількох хвилин.

Біомолекули поглинають в різних областях спектру - ультрафіолетовій (УФ), видимій, інфрачервоній (ІЧ). Їх спектри поглинання є складними, залежать від структури і властивостей молекул.

### 3. ПРИНЦИП РОБОТИ І ОПТИЧНА СХЕМА СПЕКТРОФОТОМЕТРА

Спектрофотометр СФ-17 призначений для вимірів оптичної густини  $D$  і коефіцієнту пропускання  $T$  в області від 200 до 1200 нм. При дослідженнях у видимій і ІЧ областях як джерело світла використовують лампу розжарювання, а в УФ області - водневу лампу. Приймачами світла служать фотоелементи. Фотострум підсилюється і вимірюється за допомогою відлікового потенціометра і мікроамперметра. Оптична схема приладу - автоколімаційна (рис. 1). Світло від джерела струму 1 або  $1^1$  попадає на дзеркальний конденсор 2, який направляє його на плоске дзеркало 3. Дзеркало відхиляє пучок променів на кут  $90^\circ$  і направляє його на вихідну щілину приладу 4, захищену пластинкою 5. Від дзеркального об'єктива 6

паралельний пучок променів попадає на диспергуючу призму 7, яка розкладає його в спектр. Пройшовши призму під кутом, близьким до кута найменшого відхилення, пучок фокусується об'єктивом на вихідній щілині 8. Обертаючи призму, можна отримати на виході монохроматора світло різних довжин хвиль, яке, пройшовши щілину 8, кварцеву лінзу 9, фільтр 10, еталон (зразок) 11 і захисну пластинку 12, попадає на світлочутливий шар фотоелемента 13.

Методика роботи на спектрофотометрі СФ-17 описана в лабораторній інструкції.

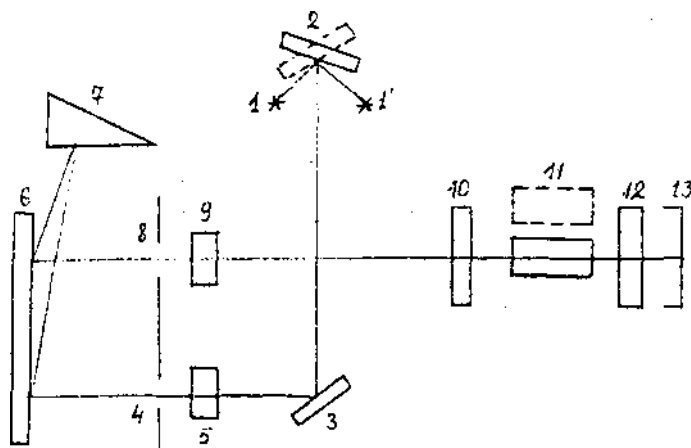


Рис. 1. Оптична схема спектрофотометра СФ-17.

#### 4. ЗАВДАННЯ І ПОРЯДОК ВИКОНАННЯ РОБОТИ

##### 4.1. ВИМІРЮВАННЯ СПЕКТРІВ ПОГЛИНАННЯ НУКЛЕЇНОВИХ КИСЛОТ І ЇХ КОМПОНЕНТІВ

Приготувати розчин НК (ДНК, РНК) у буферному розчині (0,15 М NaCl + 0,015 М цитрат Na) концентрацією 50 мкг/мл. Дослідити спектри поглинання і пропускання розчину НК в області 230-320 нм через кожні 5 нм. Побудувати криву спектрів поглинання і пропускання, відкладаючи по



осі абсцис довжину хвилі  $\lambda$ , а по осі ординат - оптичну густину розчину  $D$  або коефіцієнт пропускання  $T$ . За відношенням  $D_{280}/D_{260}$  оцінити домішки білка в препараті НК. Зняти спектр поглинання суміші азотистих основ (аденіну, тиміну, гуаніну, цитозину) і порівняти із спектром НК.

#### 4.2. ВИМІРЮВАННЯ СПЕКТРІВ ПОГЛИНАННЯ АРОМАТИЧНИХ АМІНОКИСЛОТ ТА БІЛКІВ

Приготувати водні розчини амінокислот таких концентрацій: триптофан 0,0147 мг/мл; тирозин - 0,053 мг/мл; фенілаланін - 0,352 мг/мл. Зняти спектри поглинання цих розчинів в області від 210 до 320 нм через 5 нм. За отриманими значеннями оптичної густини при  $D = 250$  нм і  $D = 280$  нм розрахувати молярний коефіцієнт екстинції амінокислот. Молярна маса триптофану - 204, тирозину - 181, фенілаланіну - 165. Приготувати розчини білка концентрацією 0,1; 0,2; 0,4; 0,6 мг/мл. Зняти спектри поглинання препаратів, провести порівняння спектрів і проаналізувати відмінності. Перевірити справедливість закону Бугера- Ламберта-Бера для білкових розчинів. Порівняти спектри білків із спектрами ароматичних амінокислот.

#### 4.3. ПОБУДОВА СХЕМИ ЕНЕРГЕТИЧНИХ РІВНІВ БІОМОЛЕКУЛ

На основі отриманих спектральних даних за формулою (5) розрахувати значення енергії в електронвольтах відповідних збуджених електронних станів для молекул НК, азотистих основ, білків та амінокислот. Оцінити ширину електронних рівнів ( $1 \text{ eV} = 1,6 \cdot 10^{-19} \text{ Дж}$ ). Побудувати схему енергетичних рівнів досліджуваних молекул. За спектральними даними побудувати енергетичні діаграми. Оцінити імовірності збудження, іонізації та розривів зв'язків (ковалентних, водневих тощо) у первинній та вищих структурах макромолекул. Врахувавши можливість утворення димерів тиміну та інших збуджених молекул піримідинових основ в ДНК і РНК, пояснити механізм дії бактерицидних УФ ламп.

## 5. КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ

1. Яку інформацію можна одержати за допомогою спектральних методів
2. Основний закон фотобіофізики.
3. Закон Бугера-Ламберта-Бера.
4. Фізичний зміст оптичної густини.
5. Що таке спектр поглинання, спектр пропускання?
6. В якій спектральній області поглинають білки, нуклеїнові кислоти?
7. Хромофори в біополімерах. Біомедичне значення димерів тиміну.
8. Принцип роботи спектрофотометра.

## ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 3

### ФЛУОРЕСЦЕНТНА СПЕКТРОСКОПІЯ БІОМЕДИЧНИХ ОБ'ЄКТІВ

1. МЕТА РОБОТИ: Закріпити теоретичні знання про закономірності перетворення енергії в біосистемах, про роль збуджених станів молекул в біопроесах. Практично ознайомитись із прийомами лазерного та електронного збудження молекул та сучасними методами реєстрації випромінювання.

#### 2. ТЕОРЕТИЧНІ ВІДОМОСТІ

Повна енергія молекули складається із енергії електронного збудження  $E_e$ , коливної енергії  $E_k$  і обертальної енергії  $E_{об}$ . тобто:

$$E = E_e + E_k + E_{об}$$

Поглинання системою додаткової енергії супроводжується виникненням збуджених станів, які мають певний час життя і структуру. Імовірні електронні переходи і енергетичні стани молекули часто зображають у вигляді схеми рівнів енергії, де кожен електронний рівень розщеплюється на ряд коливних підрівнів, а кожен коливний - на багато обертальних підрівнів.

Особливістю молекул більшості речовин є швидка внутрішня конверсія з часом  $\sim 10^{-13}$  с на найнижчий коливний підрівень першого збудженого електронного стану  $S_1$ . Саме з цього рівня при переході на довільний коливний підрівень основного стану  $S_0$  і відбувається випромінювання - *флуоресценція*.

Залежність інтенсивності флуоресценції від довжини хвилі називається *спектром флуоресценції*. Відношення кількості квантів флуоресценції до поглинутих квантів є *квантовим виходом*.

*За законом Вавілова:* спектр і квантовий вихід флуоресценції не залежать від енергії поглиненого молекулою кванта. Оскільки енергія поглиненого кванта частково витрачається на теплові коливання, енергія кванта флуоресценції завжди менша. Тобто, спектр флуоресценції зсунутий у довгохвильовий бік відносно найбільш довгохвильової смуги поглинання - *закон Стокса*. Смуги флуоресценції і поглинання дзеркально симетричні відносно так званого *O-O*-переходу. Це єдиний перехід, який має однакову енергію поглинання і флуоресценції.

*Принцип Франка-Кондона:* поскільки поглинання енергії проходить за короткий час, то при цьому стан та імпульси ядер атомів не змінюються.

Випромінювальний перехід (заборонений по спіну) з першого триплетного рівня на основний ( $T_1 - S_0$ ) приводить до появи *фосфоресценції*. Час життя фосфоресценції набагато більший, ніж флуоресценції. Випромінювання із триплетних станів можна виявити при збудженні молекул електронним ударом. Залежно від енергії електронного пучка, крім збудження *S* і *T* - рівнів, при взаємодії молекул з електронами з певною імовірністю проходять процеси іонізації та фрагментації молекул.

## ЗАВДАННЯ 1. ВИВЧЕННЯ ФОТОЛЮМІНЕСЦЕНЦІЇ БІОМОЛЕКУЛ

### ОПИС ЛАБОРАТОРНОГО ОБЛАДНАННЯ

Робота виконується на установці, основною частиною якої є лазерний флуориметр. Блок-схема флуориметра показана на рис. 1.

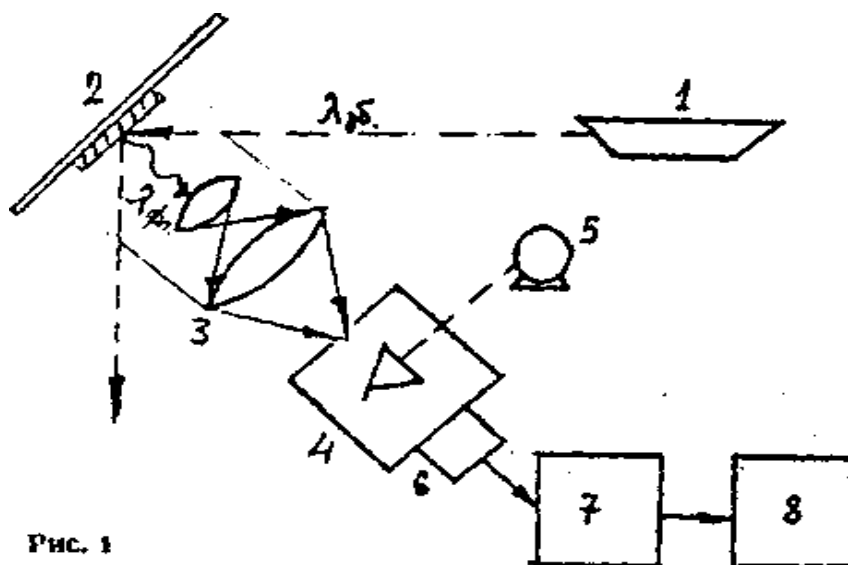


Рис. 1

Рис. 1. Блок-схема флуориметра.

Випромінювання лазера 1 направляється під кутом  $45^\circ$  на досліджуваний об'єкт 2. Індукована лазером флуоресценція об'єкту проходить через коліматор 3 і фокусується на вхідній щілині монохроматора 4. 5 – електродвигун. Вихідна щілина монохроматора зв'язана з фотоприймачем 6, сигнал з якого проходить через підсилювач 7 і реєструється самописцем 8.

Для візуального спостереження за випромінюванням зафарбованих препаратів використовується люмінесцентний мікроскоп (наприклад МЛ-2) з біокулярною насадкою.

Залежності від спектрів поглинання барвників - сенсibilізаторів для збудження люмінесценції -- використовується азотний або перестроюваний лазер, воднева або ртутна лампи з фільтрами.

## ПОРЯДОК ВИКОНАННЯ РОБОТИ

1. Приготувати препарати лейкоцитів з барвниками (наприклад акридиновими, кумариновими, псораленовими тощо) концентрацією 200 мкг/мл на фізіологічному розчині (0,9% NaCl).

2. Зняти спектр люмінесценції препаратів в області 400-600 нм. Для довжини хвилі, яка відповідає максимуму свічення, через кожні 10 хвилин протягом 1-2 год. вимірювати інтенсивність люмінесценції.
3. При роботі з люмінесцентним мікроскопом візуально підрахувати кількість лейкоцитів червоного, оранжевого і зеленого кольорів.
4. Побудувати графіки спектру люмінесценції  $I=I(\lambda)$  і кінетичної кривої  $I = I(t)$  для зафарбованих клітин.
5. Записати спектри люмінесценції нуклеїнових кислот і кінетичні криві для зафарбованих препаратів. Побудувати відповідні графіки.
6. Проаналізувати спектри люмінесценції біооб'єктів та їх інформативність для цілей біомедицини.
7. Базуючись на отриманих даних, пояснити механізми фотодинамічного ефекту та перспективи його використання у лазерній хірургії.

## ЗАВДАННЯ 2. ВИВЧЕННЯ ВЗАЄМОДІЇ БІОМОЛЕКУЛ З ЕЛЕКТРОНАМИ МАЛИХ ЕНЕРГІЙ

### ОПИС УСТАНОВКИ

Експериментальна установка для вивчення взаємодії молекул з електронним пучком регульованих енергій складається з таких основних вузлів: джерела електронного (1) та молекулярного (2) пучків, систем реєстрації випромінювання (3), іонів та фрагментів молекул (4) (рис. 2). Щоб уникнути поглинання повільних електронів до взаємодії з біомолекулами, досліди проводять у вакуумній камері. Енергія електронного пучка змінюється в межах 0-300 еВ.

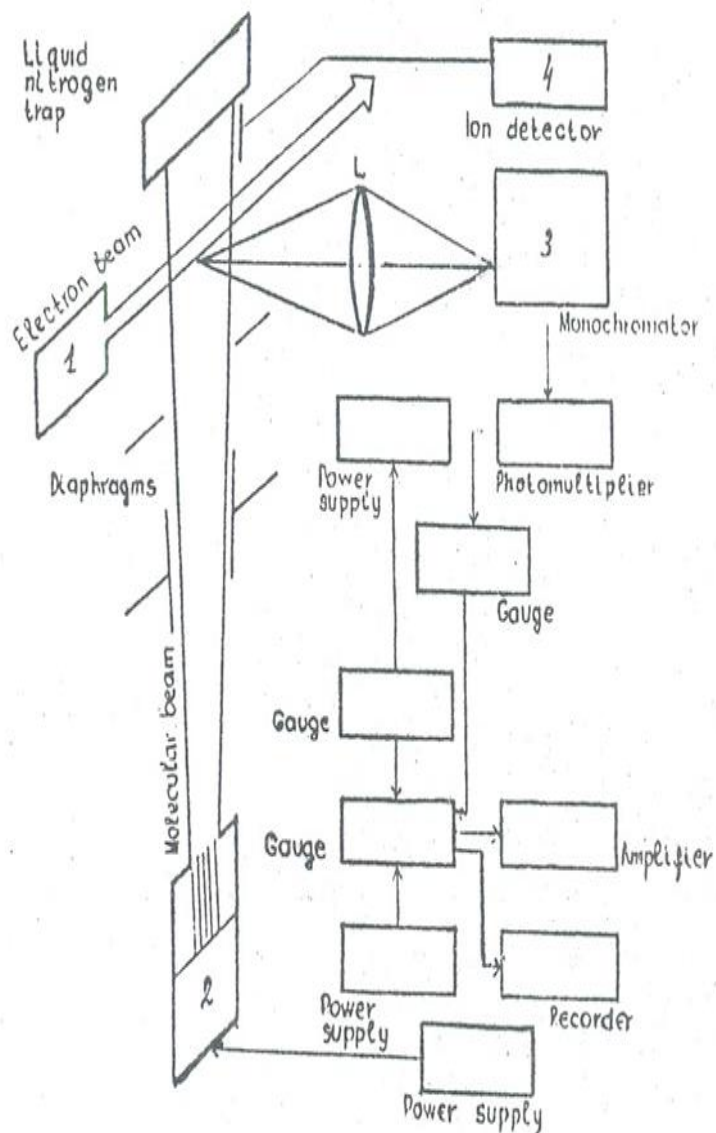


Рис. 2. Вузли експериментальної установки для вивчення взаємодії молекул з електронним пучком: 1 – джерело електронного пучка, 2 – молекулярного пучка, 3 – система реєстрації випромінювання, 4 – система реєстрації іонів та фрагментів молекул.

## ПОРЯДОК ВИКОНАННЯ РОБОТИ

1. Ознайомитись з основними блоками експериментальної установки в науково-дослідній лабораторії. Проаналізувати результати досліджень процесів збудження, іонізації та фрагментації молекул нуклеїнових кислот та їх складових.
2. Побудувати відповідні схеми енергетичних рівнів.

### 3. КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ

1. Які процеси відносяться до фотобіологічних? Охарактеризувати види фотобіологічних процесів.
2. Основні стадії фотопроцесів.
3. Фотобіологічні зміни в білках і нуклеїнових кислотах і методи їх вивчення.
4. Механізм бактерицидної дії ультрафіолетових променів.
5. Явище фотосенсибілізації, його механізми і практичне використання.
6. Закони люмінесценції.
7. Особливості збудження молекул електронним ударом



## ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 4

### ДОСЛІДЖЕННЯ ЕЛЕКТРИЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ БІОСИСТЕМ

1. МЕТА РОБОТИ: Засвоїти методи вивчення електричних характеристик біологічних об'єктів та закономірностями проходження постійного та змінного струму через клітини.

#### 2. ТЕОРЕТИЧНІ ВІДОМОСТІ

Біологічні об'єкти мають властивості і провідників, і діелектриків.

*Провідність* біооб'єктів зумовлена наявністю вільних зарядів - електронів та іонів, які під дією поля рухаються до електроду з протилежним знаком. Так виникає *струм провідності*.

*Діелектричні властивості* біооб'єктів визначаються їх структурними компонентами, наявністю зв'язаних зарядів та явищами поляризації. Зв'язані заряди під дією поля мають можливість переміщатися лише в невеликих межах, створюючи *струм зміщення*.

Процес переміщення зв'язаних зарядів під дією електричного поля і утворення внаслідок цього електрорушійної сили, направленої проти зовнішнього поля, називається *поляризацією*.

Поляризація у живих клітинах є причиною зменшення величини струму  $I$  при його проходженні через біологічну систему протягом певного часу  $t$ . У системі виникає електрорушійна сила поляризації  $P(t)$ , протилежно напрямлена до зовнішньої напруги  $U$ . Закон Ома для біологічного об'єкту матиме вигляд:

$$I = \frac{U - P(t)}{R},$$

де  $R$  - опір об'єкта постійному струму.

Основну роль в біосистемах відіграють дипольна і макроструктурна види поляризації, оскільки у клітинах міститься багато заряджених молекул і поверхонь розділу - мембран. Явища поляризації можуть бути описані за допомогою діелектричної проникності речовини.

Діелектрична проникність  $\varepsilon$  характеризує зменшення величини електричного поля в речовині  $E$  в порівнянні з величиною електричного поля у вакуумі  $E_0$ :

$$\varepsilon = \frac{E_0}{E}.$$

Опір живої тканини складається з великої кількості омичних і ємнісних опорів, з'єднаних між собою. Сумарний опір системи називається ефективним опором або *імпедансом*. Імпеданс у загальному випадку складається з омичного опорів і опорів ємності і самоіндукції. Закон Ома виразиться формулою:

$$I = \frac{U}{Z},$$

де  $I$  - сила струму;  $U$  - напруга;  $Z$  - імпеданс.

Величина імпедансу визначається як:

$$Z = R - iX,$$

де  $R$  — активна, омична, складова,  $X$  - реактивна складова опорів, яка визначається ємністю та індуктивністю системи.

Поскілки у клітинах явище самоіндукції не виявлено, то імпеданс буде визначатись геометричною сумою лише активного і ємнісного опорів. Електрична модель біологічного об'єкту може бути представлена у вигляді

різних комбінацій ємностей  $C$  і омичних опорів  $R$  (так званих еквівалентних схем).

Для *послідовного* з'єднання  $C$  і  $R$  імпеданс  $Z$  визначається за формулою:

$$Z = R - i \frac{1}{\omega C} \quad \text{або} \quad Z^2 = R^2 + \frac{1}{C^2 \omega^2}. \quad (1)$$

Для *паралельного*

$$\frac{1}{Z} = \frac{1}{R} - i \omega C \quad \text{або} \quad \frac{1}{Z^2} = \frac{1}{R^2} + \omega^2 C^2 \quad (2)$$

де  $\omega$  – кругова частота змінного струму,  $i$  – уявна одиниця,  $i = \sqrt{-1}$ .

Із цих формул видно, що імпеданс об'єктів змінюється з частотою струму - *при збільшенні частоти реактивний опір зменшується*.

Залежність величини імпедансу від частоти струму називається *дисперсією імпедансу*.

Явище дисперсії імпедансу використовують в біології, біофізиці та медицині для вивчення фізико-хімічної структури живої клітини і тканин. Зруйновані клітини або клітини з порушеним обміном речовин не спроможні забезпечити достатню поляризацію мембран та інших структур. В результаті цього ємнісний опір зменшується до нуля.

Порушення життєздатності клітин можна оцінити кількісно, порівнявши величини опорів при проходженні електричного струму різних частот. Для оцінки використовують *коефіцієнт поляризації*:

$$K = \frac{Z(10^4)}{Z(10^6)}, \quad (3)$$

де  $Z(10^4)$  і  $Z(10^6)$  - опори, вимірювані на частотах  $10^4$  і  $10^6$  Гц.

Електропровідність біооб'єктів змінюється при збудженні клітин, при проходженні потенціалу дії, при м'язовому скороченні, при рості рослин, дії на них світла. За допомогою даного методу досліджують процеси зв'язування іонів молекулами білків і нуклеїнових кислот, оцінюють ступінь їх гідратації, розміри релаксуючих частинок. Метод електропровідності застосовується для оцінки життєздатності клітин при трансплантації, при різних патологічних процесах - опіках, променевих ураженнях тощо.

### 3. ОПИС ЛАБОРАТОРНОГО ОБЛАДНАННЯ

Вимірювання імпедансу біологічного об'єкту і дослідження його частотної залежності проводиться на установці, яка складається з генератора коливаний ГЗ-111, моста змінного струму Р 5021 з нуль-індикатором та електродної камери. Принципова електрична схема моста для визначення ємності і опору об'єктів приведена на рис. 1.

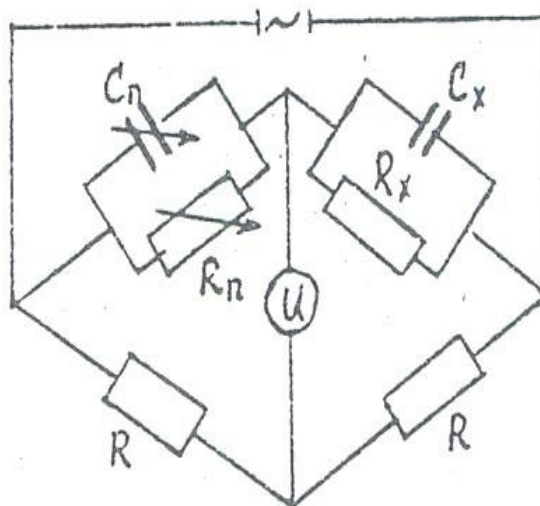


Рис.1.  $R$  - омичний опір зрівноважених плеч моста;  $C_x$  і  $R_x$  - параметри об'єкту;  $C_n$  і  $R_n$  - ємність і опір, компенсуючі параметри моста;  $U$  - нуль-індикатор балансу моста.

#### 4. ЗАВДАННЯ І ПОРЯДОК ВИКОНАННЯ РОБОТИ

Підготувати біологічний препарат рослинного або тваринного походження і розмістити його на електродах експериментальної камери. Зібрати установку, яка складається з моста змінного струму Р 5021, нуль-індикатора Ф 582, електродної камери з біооб'єктом та генератора сигналів ГЗ-111. Вибрати еквівалентну схему заміщення. Подати з генератора потрібну частоту в діапазоні від 500 до 200 кГц. Для кожної частоти за допомогою моста змінного струму і нуль-індикатора провести вимірювання ємності  $C_x$  і активної складової імпедансу  $R_x$ . Результати представити у вигляді графіків залежностей  $\lg Z$  від  $\lg \omega$ . За співвідношенням (3) обчислити коефіцієнт поляризації.

Діелектрична проникність  $\epsilon$  і тангенс діелектричних втрат  $\operatorname{tg} \delta$  знаходяться за такими формулами:  $\vec{\epsilon} = \epsilon' - i\epsilon''$  де  $\vec{\epsilon}$ - комплексна діелектрична проникність;  $\epsilon'$  дійсна діелектрична проникність;  $\epsilon''$  – уявна діелектрична проникність. Модуль  $\vec{\epsilon}$ :  $\epsilon = \sqrt{\epsilon'^2 + \epsilon''^2}$ .

Для загального випадку:

$$\epsilon = \frac{C}{C_0} = \epsilon' \sqrt{1 + \operatorname{tg}^2 \delta},$$

де  $\operatorname{tg} \delta$  - тангенс діелектричних втрат,  $C_0$  - ємність електродів у вакуумі (повітрі).

$$\operatorname{tg} \delta = \epsilon'' / \epsilon'.$$

Для послідовної схеми заміщення біооб'єкту:

$$\operatorname{tg} \delta = \omega RC$$

Для паралельної схеми заміщення біооб'єкту

$$\operatorname{tg} \delta = \frac{1}{\omega R c} ,$$

Розмір частинок  $a$ , які проявляють релаксацію на частоті  $\omega_m$ , можна оцінити із формули:

$$\omega_m = 12kT/\eta a^3,$$

де  $k$  - стала Больцмана,  $T$  - абсолютна температура,  $\eta$  - в'язкість середовища (об'єкту).

Знаючи ці величини, можна побудувати 'залежності: дисперсії діелектричних проникностей:  $\varepsilon = f(\omega)$ ;  $\varepsilon' = f(\omega)$  та  $\varepsilon'' = f(\omega)$ , а також діаграми Коул-Коула  $\varepsilon'' = f(\varepsilon')$ ;  $X = f(R')$ ;

Базуючись на отриманих даних, зробити висновки про розміри релаксуючих структур та про біомедичну цілісність препаратів і їх здатність для трансплантації.

#### КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ

1. Провідність і діелектричні властивості біооб'єктів.
2. Який процес називається поляризацією?
3. Види поляризації.
4. Закон Ома для біооб'єктів.
5. Дисперсія імпедансу та діелектричної проникності.
6. Коефіцієнт поляризації.

## ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 5

### МАС-СПЕКТРОМЕТРІЯ БІООБ'ЄКТІВ

1. МЕТА РОБОТИ: З'ясувати фізичні основи мас-спектрометричного методу та перспективи його застосування у біофізиці, медицині, фармакології та екології.

#### 2. ТЕОРЕТИЧНІ ВІДОМОСТІ

За допомогою мас-спектрометрії можна отримати унікальну інформацію, недоступну для інших методів, наприклад про структурні перетворення біомолекул, про біотрансформацію медичних препаратів тощо. Крім того, мас-спектрометрія незамінна для експрес-аналізу, ідентифікації та кількісного визначення забруднювачів навколишнього середовища хімічної чи біологічної природи.

Суть мас-спектрометричних вимірів – виявлення вмісту різних за своїм хімічним чи ізотопним складом сполук і визначення їх молекулярної чи атомної ваги. Такі виміри можливі завдяки просторовому розділенню за відношенням маси до заряду ( $m/q$ ).

Отже, мас-спектрометр повинен складатися із таких частин:

А) Іонне джерело - пристрій для іонізації атомів або молекул досліджуваного зразка і формування достатньо вузького іонного пучка. Використовують різні способи іонізації: електронний пучок, бомбардування атомами, осколками ядер, важкими іонами, польова іонізація, фотоіонізація (в т.ч. лазерна).

Б) Аналізуюча система, яка забезпечує розділення у просторі іонів з різними відношеннями "маса-заряд" ( $m/q$ ). За типом аналізуючої системи розрізняють статичні і динамічні мас-спектрометри. У статичних мас-спектрометрах для розділення іонів використовують електричні і магнітні

поля, постійні або практично не змінні за час прольоту іону через прилад. Іони з різними значеннями  $m/q$  рухаються в аналізаторі по різних траєкторіях. Радіус траєкторії  $R$ :

$$R = \frac{mv}{qB} \quad (1)$$

де  $v$  - швидкість іону,  $B$  - індукція магнітного поля.

У динамічних мас-спектрометрах для розділення іонів використовують різні часи прольоту іонами певної віддалі, а також вплив на них імпульсних або радіочастотних електричних полів малого періоду. Швидкість  $v$ , з якою іони рухаються в аналізаторі, залежить від  $m/q$  і визначається виразом:

$$v = \frac{L}{t} = \sqrt{2U \frac{q}{m}}, \quad (2)$$

де  $L$  - довжина простору дрейфу;  $t$  - час прольоту іоном віддалі  $L$ ;  
 $U$  - прискорююча напруга.

В) Реєструюча система, яка визначає кількість іонів з даним відношенням  $m/q$ . Це може бути циліндр Фарадея, електронний помножувач, сцинтиляційний перетворювач.

Г) Вакуумна система, яка забезпечує неспотворені траєкторії руху іонів.

### 3. ОПИС ЛАБОРАТОРНОГО ОБЛАДНАННЯ

Блок-схема будови мас-спектрометра МИ-1201 приведена на рис. 1.



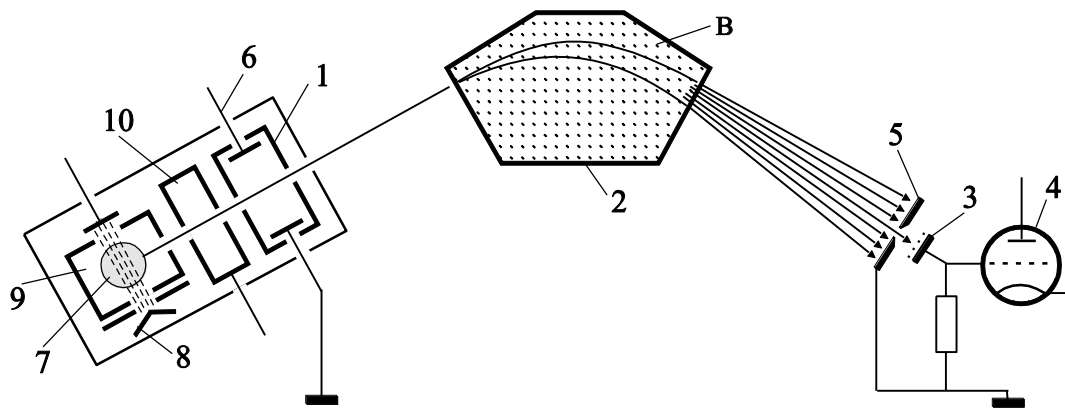


Рис. 1. Блок-схема експериментальної установки: 1 – прискорюючий електрод; 2 – електромагніт; 3 – приймач іонів; 4 – підсилювач; 5 – вхідна щілина приймача; 6 – відхиляючий електрод; 7 – молекулярний пучок; 8 – катод; 9 – іонізаційна камера; 10 – витягаючий електрод; В – магнітне поле.

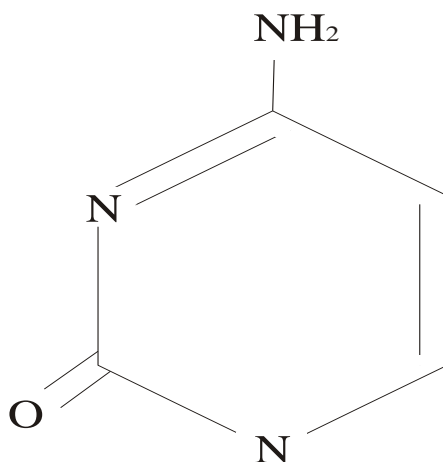
#### 4. ПОРЯДОК ВИКОНАННЯ РОБОТИ

Ознайомитись у науково-дослідній лабораторії з будовою та роботою експериментальних мас-спектрометричних установок:

- 1) статичного мас-спектрометра МИ-І201 з джерелом іонів типу Ніра з енергією електронів 3-150 еВ;
- 2) динамічного часо-пролітного мас-спектрометра МСХ-5.

Ознайомитись із технологією приготування препаратів біомолекул для мас-спектрометричних досліджень.

Проаналізувати отримані мас-спектри азотистих основ нуклеїнових кислот. За даними таблиці визначити структурні формули фрагментів цитозину, які утворилися під дією пучка електронів з енергією 100 еВ. Молекулярна вага цмтозину 111.



## ЦИТОЗИН

Рис. 2. Структурна формула молекули.

**Таблиця 1.** Абсолютні величини перерізів утворення позитивних іонів молекул цитозину та їх фрагментів при енергії електронів 95 еВ

m/z, а.о.м.	Іони	$\sigma, 10^{-16} \text{ см}^2$
111	$C_4H_5N_3O^+$	1,65
95	$C_4H_3N_2O^+; C_4H_5N_3^+$	0,17
83	$C_3H_3N_2O^+; C_3H_5N_3^+$	0,25
81	$C_3H_3N_3^+$	0,17
79	$C_4H_3N_2^+$	0,11
69	$C_3H_5N_2^+$	0,52
68	$C_3H_4N_2^+$	0,32
67	$C_3HNO^+; C_3H_3N_2^+$	0,36
56	$C_2H_2NO^+; CN_2O^+$	0,09
55	$C_2H_3N_2^+$	0,17
52	$C_3H_2N^+$	0,10
44	$CH_2NO^+$	0,35
43	$CHNO^+$	0,27

42	$CH_2N_2^+$ ; $CNO^+$	0,62
41	$CHN_2^+$ ; $C_2H_3N^+$	0,36
40	$C_2H_2N^+$	0,40
39	$C_2HN^+$	0,16
29	$COH^+$	0,12
28	$CO^+$ ; $CH_2N^+$	0,60
27	$CHN^+$	0,12
18	$H_2O^+$	0,14
17	$OH^+$	0,11
16	$O^+$ ; $NH_2^+$	0,12

## 5. КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ

1. Будова і принцип роботи мас-спектрометра.
2. Основні закономірності взаємодії біомолекул з пучком електронів, атомів та лазерним випромінюванням.
3. Використання мас-спектрометрії в біології та медицині.

## ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 6

### ЕЛЕКТРОННА МІКРОСКОПІЯ БІОМАТЕРІАЛІВ

1. МЕТА РОБОТИ: Ознайомитись з принципами роботи і можливостями використання у біофізичних дослідженнях сучасних електронних мікроскопів.

#### 2. ТЕОРЕТИЧНІ ВІДОМОСТІ

Електронна мікроскопія відноситься до прямих методів вивчення біооб'єктів. За її допомогою протягом більш як 80 років отримано багато унікальних і точних результатів про будову найменших біологічних об'єктів та про їх зміни під дією фізико-хімічних факторів. Це єдиний метод, який дозволяє "бачити" біомолекулу, візуально виміряти її довжину та інші параметри.

Теоретична основа електронної мікроскопії - це уявлення про хвильові властивості мікрочастинок. Роль променів у електронних мікроскопах виконують прискорені електрони, довжина хвилі яких знаходиться із рівняння:

$$\lambda = \frac{h}{\sqrt{2eUm}}$$

де  $U$  - прискорююча напруга;  $e$  та  $m$  - відповідно заряд і маса електрона;  $h$  - стала Планка. Із врахуванням релятивістських ефектів

$$\lambda = \frac{1.23}{\sqrt{U + 0.98 \cdot 10^{-6}U^2}}$$

Наприклад, при  $U = 100$  кВ  $\lambda = 4 \cdot 10^{-12}$  м.

Електрони, проходячи через речовину, змінюють свої траєкторії - розсіюються. Відносна кількість електронів, розсіяних на кут, більший ніж  $\vartheta$ , знаходиться із співвідношення:

$$\frac{\Delta N}{N} = \frac{\rho N_A}{A} \cdot \frac{Z^2 e^2}{U^2 \vartheta^2} \left(1 + \frac{1}{Z}\right) d.$$

де  $\rho$  - густина досліджуваної речовини;  $N_A$  - число Авогадро;  $A$  - атомна вага;  $U$  - прискорююча напруга;  $e$  - заряд електрона;  $d$  - товщина зразка;  $Z$  - атомний номер речовини.

Таким чином, кількість розсіяних електронів зростає із збільшенням густини речовини, її атомного номера, товщини зразка.

Роздільна здатність мікроскопа

$$L = \frac{A}{0.5\lambda} = \frac{\sqrt{2eUm}}{0.5h}$$

Тут  $A$  - числова апертура, рівна добутку показника заломлення на синус половини апертурного кута.

На практиці для електронних променів з невеликою апертурою роздільна здатність становить кілька одиниць  $10^{-10}$  м. Утворення контрасту в електронному зображенні відбувається за рахунок розсіяння електронів частинками препарату з різною густиною. Цим методом можна досліджувати лише спеціально підготовлені препарати. Потрібно врахувати також, що об'єкт знаходиться у вакуумі. Крім цього, при  $U > 100$  кВ біоматеріал може руйнуватись під дією електронів.

Основні методи підготовки препаратів: виготовлення тонких зрізів ( $\sim 10^{-8}$  м); збільшення контрастності за допомогою напилення під різними кутами важких металів (Pt, Pd); виготовлення реплік з відтінюванням;

залівка об'єкту пластмасою з подальшою полімерізацією і отриманням твердих зрізів; спеціальні способи однакової орієнтації макромолекул в зразку.

Для електронно-мікроскопічного вивчення молекул нуклеїнових кислот широко використовується для підготовки зразків метод Клайншмідта. Суть методу: кругове напилення контрастного матеріалу; отримання моношарів ДНК на білковій підложці, розміщеній на спеціальній сіточці.

### 3. КОНСТРУКЦІЯ ЕЛЕКТРОННОГО МІКРОСКОПА

Джерелом електронів є катод з підігрівом. Прискорення електронів і формування пучка здійснюється фокусуєчим електродом і анодом (електронною гарматою). На потік електронів впливає електричне поле (система електродів і конденсаторів) і магнітне поле (система котушок із струмом). Ці системи називаються електронним лінзами. Лінза-конденсор фокусує пучок електронів на зразок. Інші лінзи виконують роль об'єктива і проєктора, тобто фокусують електрони, які вже пройшли через зразок, на флуоресціюючий екран або на фотопластинку.

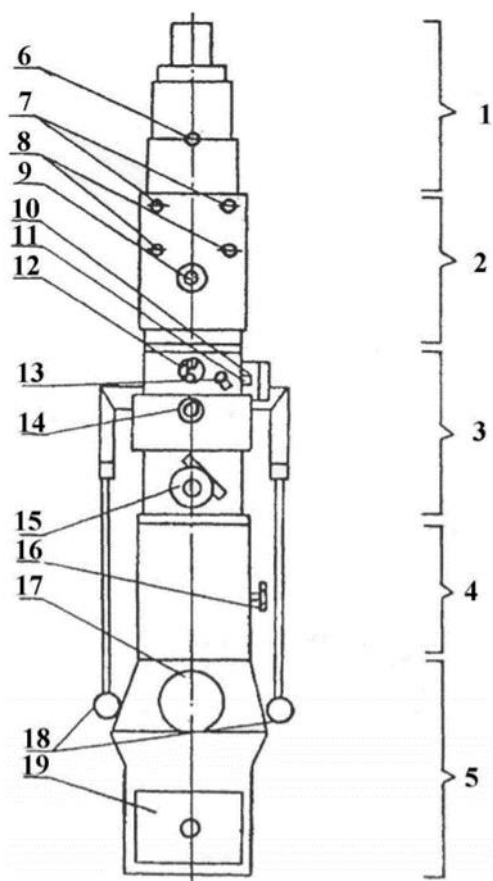


Рис. 1. Схема колони електронного мікроскопа УЭМВ-100К: 1 – електронна пушка; 2 – блок конденсорних лінз; 3 – об’єктивна лінза; 4 – проєкційний блок; 5 – тубус з фотокамерою; 6 – гвинт переміщення електронної пушки; 7 – гвинти переміщення першої конденсорної лінзи; 8 – гвинти переміщення другої конденсорної лінзи, 9 – діафрагма другого конденсора; 10 – механізм установки утримувача об’єктів у шлюзовий пристрій; 11 – клапан відкачки шлюзового пристрою; 12 – механізм керування гоніометром; 13 – ручка заглушки шлюзової камери; 14 – апертурна діафрагма; 15 – механізм мікродифракції; 16 – маховик; 17 – оглядове вікно; 18 – ручки керування столиком об’єктів; 19 – люк фотокамери.

#### 4. ПОРЯДОК ВИКОНАННЯ РОБОТИ

Ознайомитись з принципом будови і роботи лабораторного електронного мікроскопа.

Засвоїти технологію приготування препаратів біооб'єктів для електронно-мікроскопічних досліджень.

Проаналізувати електронні мікрофотографії препаратів тимусної ДНК. Визначити довжину ниток і молекулярну вагу нативних та фрагментованих ультразвуком молекул ДНК.

Зробити висновки про особливості механізмів впливу ультразвуку різних потужностей і частот на біомедичні препарати та про необхідність врахування цих факторів при ультразвуковій діагностиці та ультразвуковій терапії.

#### 5. КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ

1. Будова і принцип роботи електронного мікроскопа.
2. Від чого залежить роздільна здатність мікроскопа?
3. Способи підготовки препаратів біооб'єктів для електронної мікроскопії.
4. Основні механізми взаємодії пучка електронів з біооб'єктами.
5. Із електронних мікрофотографій ДНК зробити висновки про механізм впливу ультразвуку на біомолекули.



**ЛАБОРАТОРНА РОБОТА №7**  
**ВИВЧЕННЯ СПЕКТРАЛЬНИХ ХАРАКТЕРИСТИК СЛУХУ**  
**ЛЮДИНИ. АУДІОМЕТРІЯ**

1. **МЕТА РОБОТИ:** Вивчити основні фізичні та фізіологічні характеристики звукових коливань та практично засвоїти метод аудіометрії.

2. **ТЕОРЕТИЧНІ ВІДОМОСТІ.** Звукові коливання або звук - це коливання з частотою від 16 Гц до 20 кГц, які поширюються у пружних середовищах як поздовжні хвилі і сприймаються вухом людини. Акустика — розділ фізики, який вивчає звукові хвилі і їх взаємозв'язок з іншими явищами, — класифікує звуки так: а) *тони* - прості (гармонійні) та складні; б) *шуми* - сукупність різноманітних складних тонів, форма, тривалість, частота та інші характеристики яких невпорядковано змінюються; в) *удари* — короткочасні звукові впливи. Фізичні характеристики звукових коливань - частота коливань, інтенсивність хвилі, гармонійний спектр. Ці *об'єктивні* характеристики зумовлюють при сприйнятті звуків *суб'єктивні* (фізіологічні) відчуття, а саме: різні висоти, гучності та тембри звуків. Зокрема, тембр звуку майже повністю визначається спектральним складом. *Частота* коливань звукової хвилі оцінюється вухом як *висота* звуку. Для оцінки висоти звуку весь діапазон тонів, які сприймаються вухом, розділений на 10 інтервалів, які називаються октавами. *Октава* - це інтервал висот тону, в якому відношення крайніх частот дорівнює двом. Суб'єктивна характеристика *гучність* пов'язана з *інтенсивністю* звуку. *Інтенсивність* або *сила звуку*  $I$  - це густина потоку енергії звукової хвилі, тобто величина енергії  $E$ , перенесена хвилею за одиницю часу  $t$  через одиницю площі поверхні  $S$ , перпендикулярної напрями поширення хвилі.

$$I = E / S t.$$

Для плоскої гармонійної хвилі інтенсивність  $I$  пов'язана із звуковим тиском  $P$  співвідношенням:

$$I = \Delta P^2 / \rho v,$$

де  $\rho$  - густина середовища,  $v$  - швидкість звуку.

Людина сприймає досить широкий діапазон інтенсивностей звуку. Наприклад, на частоті 1 кГц - від  $I_0 = 10^{-12}$  Вт/м<sup>2</sup> або  $P = 2 \cdot 10^{-5}$  Па (поріг чутності) до  $I_{max} = 10$  Вт/м<sup>2</sup> або  $P_{max} = 60$  Па (поріг больового відчуття). Відношення цих інтенсивностей дорівнює  $10^{13}$ . Тому зручніше для оцінки інтенсивності звуку використовувати логарифмічну шкалу - шкалу рівнів інтенсивності. У цій шкалі значення  $I_0$  приймають за початковий рівень. Довільна інтенсивність  $I$  виражається через десятковий логарифм її відношення до  $I_0$ .

*Рівень інтенсивності*

$$L = \lg ( I / I_0 )$$

Рівень інтенсивності вимірюють у *белах* ( Б ) або *децибелах* (дБ ). За один бел (1 Б) приймають рівень інтенсивності звуку, яка в 10 разів більша від початкового рівня  $I_0$ .

Залежність гучності від інтенсивності звуку має складний характер навіть на одній і тій же частоті. Основна причина — *адаптація* до сили подразника. Ця властивість є універсальною для всіх органів чуття.

Вимірювання гучності базується на важливому психофізичному законі Вебера – Фехнера. Згідно цього закону, при збільшенні подразнення в геометричній прогресії відчуття цього подразнення зростає в арифметичній прогресії. Математично це означає, що гучність звуку  $E$  пропорційна логарифму інтенсивності звуку  $I$ :

$$E - E_0 = k \lg (I / I_0),$$

де  $k$  - коефіцієнт пропорційності, який залежить від частоти та інтенсивності звуку. Для порогу чутності  $E_0 = 0$ . Тоді:

$$E = k \lg (I / I_0)$$

Закон Вебера-Фехнера має універсальний характер, виконується і для інших біологічних сенсорних систем.

Умовно вважають, що на частоті 1 кГц шкали гучності та інтенсивності звуку повністю співпадають, тобто  $k = 1$ . Гучність виражають у *фонах*.

$$1 \text{ фон} = 1 \text{ дБ.}$$

Гучність на інших частотах вимірюють, порівнюючи досліджуваний звук із звуком частотою 1 кГц. Для знаходження відповідності між гучністю та інтенсивністю звуку на різних частотах використовують *криві рівної гучності*. Їх будують на основі усереднених даних, отриманих у людей з нормальним слухом. Нижня крива відповідає інтенсивності найслабших звуків - порогу чутності. Для всіх частот цієї кривої  $E = k \lg 1 = 0$ . Для частоти 1 кГц інтенсивність звуку  $I_0 = 10^{-12}$  Вт/м<sup>2</sup>. Верхня крива відповідає порогу больового відчуття (рис. 1).

Метод вимірювання гостроти слуху називається *аудиометрією*. При

аудиометрії на спеціальному приладі - *аудиометрі* — визначають поріг слухового відчуття на різних частотах. Отримана залежність називається *спектральною характеристикою вуха на порозі чутності* або *аудиограмою*.

### 3. ОПИС УСТАНОВКИ

Аудиометр є звуковим генератором чистих тонів різної частоти та інтенсивності. Основна частина приладу - генератор електричних гармонійних коливань звукової частоти в діапазоні від 125 до 12000 Гц. Рівень інтенсивності змінюється дискретно від 0 до 80 дБ з кроком 5 дБ. Вольтметр показує вихідну напругу з генератора - величину, квадрат якої пропорційний інтенсивності звуку:  $I \sim U^2$ .

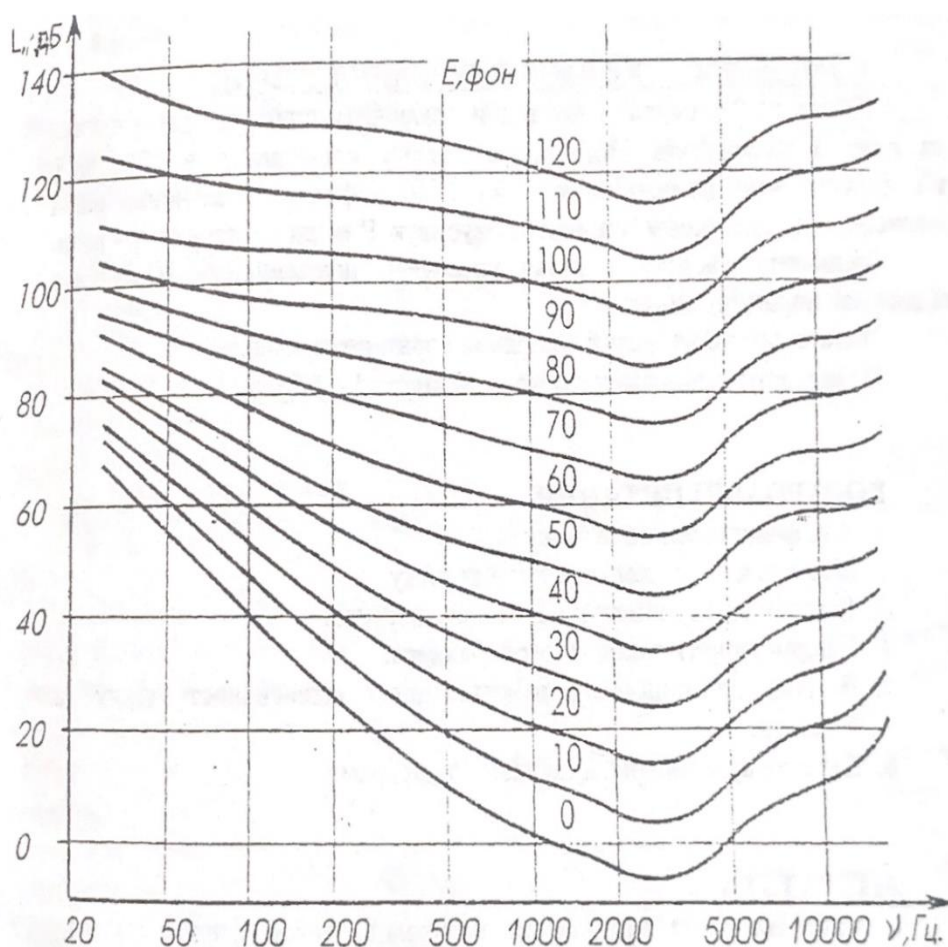


Рис 1. Криві рівної гучності.

## ЗАВДАННЯ І ПОРЯДОК ВИКОНАННЯ РОБОТИ

1. Надіти на “пацієнта” навушники і включити прилад. Подати сигнал на один з навушників. Встановити частоту коливань  $\nu = 125$  Гц і, збільшуючи інтенсивність звуку  $I$  від 0 дБ, зафіксувати значення рівня інтенсивності, при якому “пацієнт” почує звук. Виміри повторити три рази.
2. Збільшити частоту і знову визначити інтенсивність звуку, яка відповідає порогу чутності.
3. Подати сигнал на інший навушник і повторити досліди.
4. Побудувати аудіограми, тобто залежність  $I = f(\lg \nu)$ .

## КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ

1. Яка фізична природа звуку?
2. Назвати фізичні характеристики звуку.
3. Вказати характеристики слухового відчуття.
4. Сформулювати закон Вебера-Фехнера.
5. В яких одиницях вимірюються рівні інтенсивності звуку та гучність?
6. Що таке аудіометрія, аудіометр, аудіограма?

Формат 60×84/16. Умовн. друк. арк.    Зам. №    Наклад 100 прим.

Видавництво УжНУ “Говерла”

88000, м. Ужгород, вул. Капітульна, 18.

*Свідоцтво про внесення до державного реєстру видавців, виготівників  
і розповсюджувачів видавничої продукції –*

*Серія 3т №32 від 31 травня 2006 р.*