

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

ДВНЗ «УЖГОРОДСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ»

ФІЗИЧНИЙ ФАКУЛЬТЕТ

МОЛЕКУЛЯРНА БІОФІЗИКА

НАВЧАЛЬНИЙ ПОСІБНИК

Ужгород – 2022

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

ДВНЗ «УЖГОРОДСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ»

ФІЗИЧНИЙ ФАКУЛЬТЕТ

МОЛЕКУЛЯРНА БІОФІЗИКА

НАВЧАЛЬНИЙ ПОСІБНИК

Ужгород – 2022

Навчально-методичний посібник з курсу "Молекулярна біофізика" призначений для студентів фізичного факультету (зокрема, для спеціальності «Біомедична інженерія»), а також буде корисним для студентів біологів та медиків.

У посібнику аналізуються особливості моделювання біологічних систем. Розглядаються загальні біофізичні принципи побудови та функцій біомакромолекул та приведені методичні вказівки для виконання лабораторних робіт.

АВТОРИ : кандидат біологічних наук, доцент М.І.СУХОВІЯ М.І.
доктор фіз.-мат. наук професор ШАФРАНЬОШ І.І.

Рецензенти: кандидат фіз.-мат. наук, доцент Маргітич М.О.
кандидат фіз.-мат. наук, доцент Чаварга М.М.

В С Т У П

Біофізика – це наука про фізичні механізми і фізико-хімічні процеси, які лежать в основі життєдіяльності біологічних об'єктів. **Біофізика** – це фізика живих систем на різних рівнях їхньої організації: молекулярному, мембранному, клітинному, органному, популяційному.

Спеціалізації сучасної біофізики:

- **Молекулярна біофізика** вивчає фізико-хімічні властивості та функції біологічних молекул, насамперед біополімерів та молекулярних комплексів, які створюють функціональні одиниці клітин, та характер їхньої взаємодії з іонами, молекулами і радикалами, їхню просторову будову та енергетику процесів.
- **Біофізика клітини** вивчає фізико-хімічні основи функціонування клітини, будову та основні функції біологічних мембран, енергетичні процеси в клітині, її механічні, електричні властивості, каталітичну активність,
- **Біофізика органів чуття** з'ясовує молекулярні фізико-хімічні механізми рецепції, вивчає процеси трансформації енергії зовнішніх стимулів у специфічні реакції нервових клітин і механізми кодування інформації.
- **Біофізика складних систем** досліджує явища та механізми системогенезу (еволюція, індивідуальний розвиток) та функціонування живих організмів чи біоценозів (соціуму), проблеми регулювання й саморегулювання на рівні клітин, органів, організмів, біоценозів і біосфери, в цілому, та термодинамічні особливості цих процесів
- **Теоретична і математична біофізика** розглядає теоретичні основи біофізики, зокрема, питання кінетики і термодинаміки, закони і постулати квантової біофізики, особливості міграції енергії у біоструктурах, здійснює математичне моделювання біологічних процесів,
- **Прикладна біофізика** – це комплекс наукових дисциплін, розділів і напрямків біофізики, мета яких - розв'язання біофізичних проблем для конкретних технологічних і практичних застосувань.

Прикладна біофізика базується на відкриттях, зроблених при фундаментальних дослідженнях, але зосереджується на вирішенні завдань, що стоять перед технологіями, щоб найбільш ефективно використати нові наукові принципи у практичних пристроях і системах.

Прикладна біофізика здійснює цільові дослідження питань прикладного характеру, використовуючи інформацію та методи для контролю чи керування явищами задля прикладних розробок та їхнього застосування у різних сферах - медичній, екологічній, технічній (біотехнічній) тощо.

Складний спектр різноманітних напрямків прикладної біофізики успішно поєднує класичні галузі (наприклад, біомеханіка, біометрія, біоніка) з сучасними (біоінформатика, нанотехнології, біомеделектроніка та біосенсорика).

Зокрема, *біомеханіка* пов'язує функції та структуру опорно-рухового апарату з рухом біосистем (протезування, робототехніка, ергономіка, дизайн, архітектура).

Біометрія може бути метрологічна, медична, ергономічна, біотехнічна, екологічна.

Біоніка спеціалізується на створенні технічних аналогів біологічних систем чи процесів. Поряд з видатними досягненнями в області техніки і нових технологій, фантастичні результати зараз демонструє *архітектурна біоніка*.

Біоінформатика – це сучасні комунікації, нові засоби для запису, збереження, реалізації та передачі інформації (зокрема. “ДНК-флешка” – вже реальність). Програми для читання, запису, трансляції, сприйняття, обробки сигналів використовують принципи біофізики природних сенсорних систем, а також психофізики, комунікативної та ергономічної біофізики.

Інформатика, хоч не є розділом біофізики, та дуже тісно пов'язана з нею у сфері біонічного підходу (інженеринг, нейронні мережі, моделювання).

Біофізичні продуктивні технології – це біонічний, нанотехнологічний, фармакологічний, харчовий чи біопродуктивний напрямки, селективні та конструкційні матеріали тощо.

Біофізика еволюційних процесів та індивідуального розвитку – це системогенез, гомеостаз, формоутворення, провідні чинники норми розвитку та

життєдіяльності, патогенезу і їхні оздоровчий чи реабілітаційний, біомедичний, психофізичний

Біофізика періодичних (циклічних) процесів є основою біоритмології та хрономедицини, для розробки адаптаційних механізмів, фізичних умов та стимулів для компенсації чи посилення дії періодичних природних чи штучних джерел впливу;

Екологічна гео-біофізика – це дослідження, класифікація біофізичних аномалій геофізичного та антропогенного походження; контроль, запобігання і профілактика негативного впливу невагомості, вібрацій, ультразвуку, електромагнітних полів, іонізуючої радіації, ультрафіолетового випромінювання.

МАТЕМАТИЧНЕ МОДЕЛЮВАННЯ БІОЛОГІЧНИХ ПРОЦЕСІВ

1.МЕТА РОБОТИ: Ознайомитись із основними принципами моделювання в біології, практично засвоїти математичні моделі нелінійних процесів в екосистемах.

2.ТЕОРЕТИЧНІ ВІДОМОСТІ

2.1. ЗАГАЛЬНІ ПРИНЦИПИ ПОБУДОВИ МОДЕЛЕЙ БІОЛОГІЧНИХ ЯВИЩ

Біологічні системи на всіх рівнях їх організації (від молекул і клітин до популяцій та біоценозів) 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 та функціональні параметри об'єкту, які є найбільш істотними для цілей дослідження.

В 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 (функцій, графіків, рівнянь, таблиць), які описують ті чи інші властивості даного об'єкту, явища,

процесу. Використання комп'ютерів надзвичайно розширило можливості математичного моделювання.

Математичне моделювання як метод дослідження має ряд переваг.

- 1) Точність і економність способу 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, космос тощо).

Сучасна біофізика розглядає математичне моделювання як важливий і необхідний етап наукового дослідження. Широкого застосування набули математичні моделі в екології.

2.2. МОДЕЛЬ ДИНАМІКИ БІОЛОГІЧНОЇ ПОПУЛЯЦІЇ

Чисельність живих організмів, які населяють конкретну екологічну систему, не є сталою, а завжди коливається в певних межах. Ці коливання можуть мати значення і для господарської діяльності людей. Тому знання закономірностей динаміки чисельності популяцій потрібне для прогнозування можливих небажаних явищ і внесення необхідних коректив у цю динаміку. В біофізиці використовуються моделі динаміки різних популяцій - від опису популяцій клітин на рівні організмів до моделювання популяцій рослин і тварин на екологічному рівні.

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

$$\begin{aligned} dN/dt &= B(N) - D(N) \\ \text{або } dN/dt &= N \cdot [b(N) - d(N)], \quad (1) \end{aligned}$$

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).

Розглянемо розв'язки даного рівняння для трьох випадків.

1) Плодовитість і смертність особин не залежать від чисельності популяції. Це спостерігається, наприклад, при розмноженні шляхом поділу. Із (1) отримується рівняння експоненціального росту популяції:

$$dN/dt = (b-d) \cdot N = a \cdot N$$

Розв'язок цього рівняння:

$$N = N_0 e^{at} \quad (2)$$

де N_0 - початкова кількість особин, a - швидкість росту.

Динаміка такої популяції показана на рис. 1. А. Очевидно, що такий необмежений експоненціальний ріст популяції в реальності неможливий із-за обмеженості зовнішніх ресурсів: джерел їжі, місць проживання, захворювань і т.п. Завжди існують деякі гранично висока (K) і низька (M) чисельності популяції, за межами яких включаються обмежувальні механізми.

2) Чисельність популяції стабілізується, і її динаміка буде характеризуватися так званою логістичною (S -подібною) кривою (рис. 1 Б). Рівняння (2) матиме вигляд:

$$dN/dt = rN(K-M)/K \quad (3)$$

де $r = aN$ - швидкість росту при відсутності обмежень

Вираз (3) - це відоме логістичне рівняння Ферхюльста-Пірла.

Відношення $(K-M)/K$ називають "опором середовища", під яким розуміють сукупність факторів, які протидіють необмеженому росту чисельності популяції.

Рівняння (3) добре описує деякі реальні процеси, наприклад, процес розмноження пеницилінових грибків у культуральному середовищі

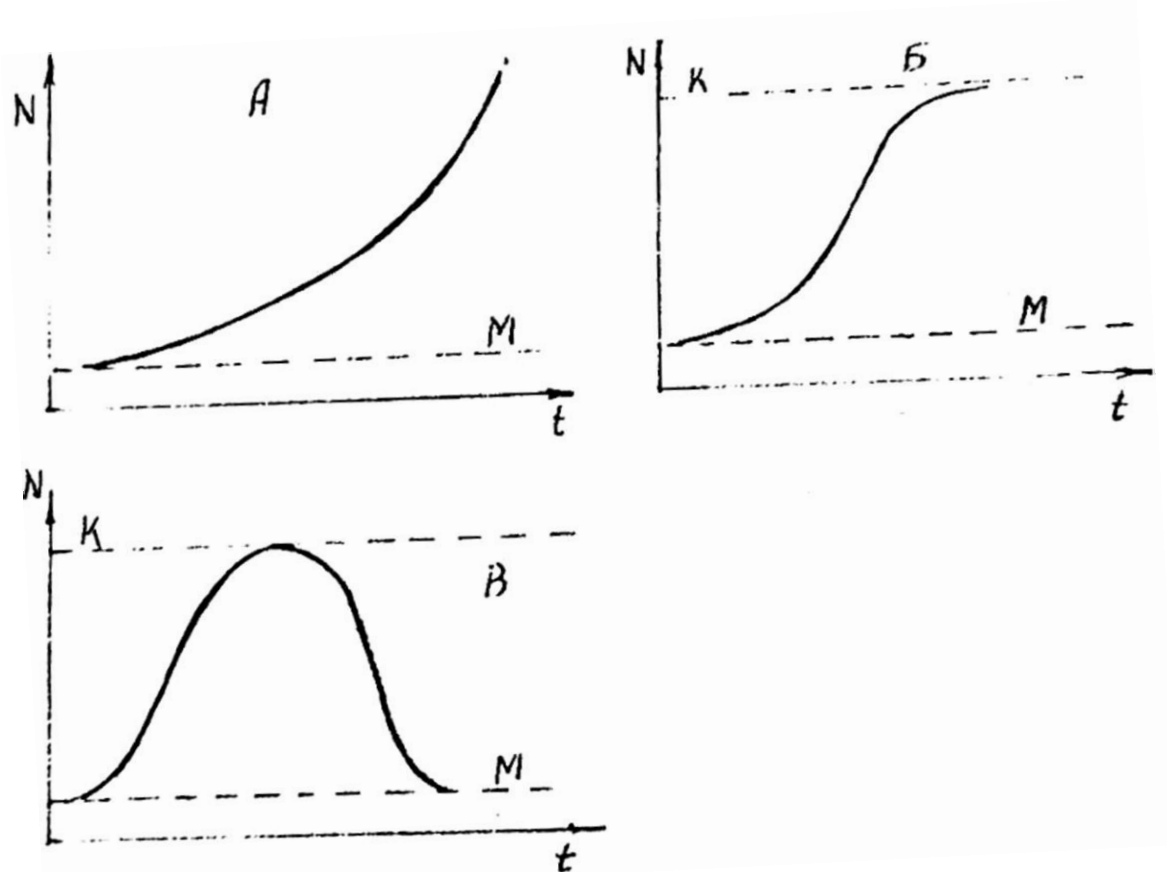


Рис.1. Деякі типи динаміки популяцій: А - крива експоненціального росту; Б - S-подібна (логістична) крива; В - експоненціальні ріст і спад чисельності (М і К – нижня і верхня межі можливої чисельності).

3) У третьому випадку після досягнення границі К наступає масова загибель особин, яка повертає чисельність популяції до деякої нижньої межі (рис 1. В) . Потім знову може початися наростання кількості особин. Такі коливання чисельності характерні для багатьох видів тварин. Є два основні типи такої динаміки: періодичний і неперіодичний . Періодичні коливання проходять переважно під впливом факторів середовища, які змінюються за певним законом, або пов'язані із особливостями самої популяції. Антропогенні фактори також здатні істотно впливати на динаміку популяцій . Велику роль відіграє в таких процесах стан популяції тих організмів, які служать для досліджуваного виду джерелом живлення або середовищем проживання Модель, яка враховує

взаємодію двох видів, складніша і вимагає розгляду додаткових рівнянь і змінних.

2. 3. МОДЕЛЬ "ХИЖАК - ЖЕРТВА"

Динаміка взаємодії двох різних популяцій є складним нелінійним процесом, який реалізується в умовах, далеких від рівноваги. Математична модель динаміки взаємодії двох видів розроблена вченими Вольтерра і Лотка. Нехай в деякому замкненому районі живуть хижаки і 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:

$$\begin{aligned} dX/dt &= k_1 X - k_2 XY & (4) \\ dY/dt &= k_2 XY - k_3 Y, \end{aligned}$$

де k_1 - константа природного розмноження жертв;

k_2 - константа взаємодії хижак-жертва;

k_3 - константа природної смертності хижаків.

Це нелінійні диференціальні рівняння. В стаціонарному режимі ліві частини цих рівнянь прирівнюються до нуля і знаходяться координати стаціонарної точки:

$$X_0 = k_3/k_2 ; \quad Y_0 = k_1/k_2$$

Розв'язок можна представити у вигляді:

$$X = X_0 + x e^{\omega t} \quad \text{і} \quad Y = Y_0 + y e^{\omega t} \quad (5)$$

де x і y - достатньо малі відхилення від стаціонарної точки X_0 і Y_0 ;

$$x < X_0 \quad \text{і} \quad y < Y_0.$$

Підставляючи (5) в рівняння (4), отримаємо рівняння для ω :

$$\omega x + k_3 y = 0 \quad \text{і} \quad -k_1 x + \omega y = 0 \quad (6)$$

Характеристичне рівняння для визначення частоти ω :

$$\omega^2 + k_1 k_2 = 0 \quad (7)$$

Таким чином, чисельності популяцій жертв X та хижаків Y змінюються з однаковою частотою ω навколо стаціонарних значень X_0 і Y_0 . Коливання чисельності особин є періодичними, але зсунутими за фазою. Вони зумовлені взаємодією між хижаками і жертвами. Якщо хижаки поїдають багато жертв, то чисельність жертв зменшується, що в кінцевому рахунку приводить до скорочення популяції хижаків. У свою чергу, зменшення чисельності хижаків сприяє росту кількості жертв і т.д. Виникають циклічні коливання X та Y , зміщені за фазою. Коливання в системі нестійкі, їхні характеристики можуть змінюватися при зовнішніх впливах.

Близькі до моделі Вольтерра-Лотка коливання будуть також спостерігатись для автокаталітичних процесів (наприклад, реакція Белоусова-Жаботинського). побудована на основі даних про кількість заготовлених шкірок. Видно, що форма реальних кривих відрізняється від теоретичних. Однак модель забезпечує співпадання найбільш істотних характеристик цих кривих - величин амплітуди і зсуву фаз між коливаннями чисельностей хижаків і жертв. Періоди коливань чисельностей зайців і рисів приблизно однакові і становлять 9-10 років. При цьому максимум чисельності зайців випереджає, як правило, максимум чисельності рисів на один рік.

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.

У природі на динаміку взаємодії популяцій впливають різні фактори навколишнього середовища. Наприклад, кліматичні умови, врожайність корму для жертви, антропогенний фактор тощо.

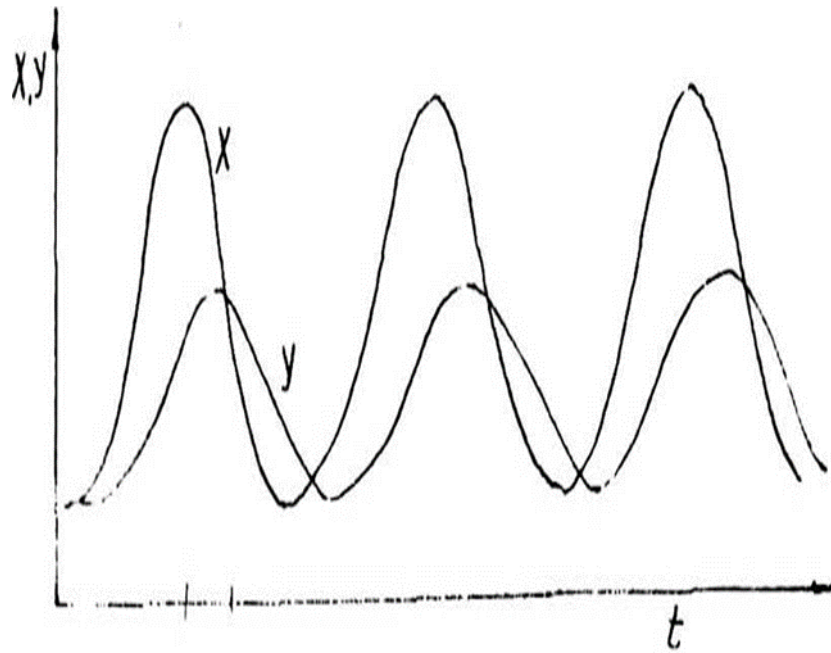


Рис.2 Зміна чисельностей північноамериканського зайця і рисі в Канаді,

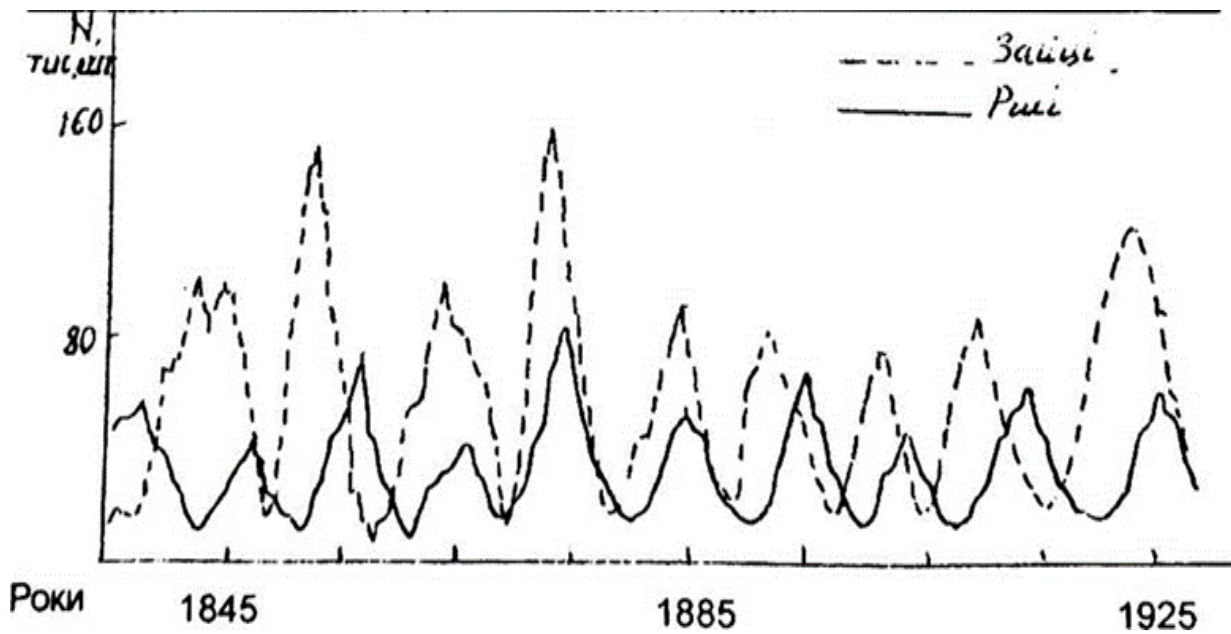


Рис.3. Криві чисельності зайців і рисів у Канаді (за К.Віллі, 1974).

Рівняння (4), яке описує динаміку популяцій, є універсальним. Такими коливаннями можна описати взаємодію різних партнерів: відносини рослин і

рослиноїдних тварин, паразитів і їх господарів. Крім того, рівняння (4) можна узагальнити на будь-яку кількість взаємодіючих популяцій.

3.Завдання і порядок виконання роботи

Для математичного моделювання біологічних процесів використовуються персональні комп'ютери. Виконання даної 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" 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.

В робочих зошитах зобразити динаміку змін чисельності популяцій для всіх розглянутих моделей.

КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ

- 1.Що таке модель об'єкту?
- 2.Види моделей у біології.
- 3.Математичні моделі і їх переваги.
- 4.Суть моделі "хижак-жертва".

5. Визначення науки біофізики. Предмет, завдання і розділи біофізики. Біофізичні методи. Прикладна біофізика. Взаємозв'язок історичного розвитку фізики та біофізики.
6. Класифікація термодинамічних систем. Живі організми як відкриті термодинамічні системи.
7. Перший і другий закони термодинаміки для біологічних процесів.
8. Стаціонарний стан і термодинамічна рівновага. Теорема Пригожина.
9. Зв'язок ентропії та інформації.
10. Лінійна і нелінійна термодинаміка. Дисипативні структури та біфуркаційні точки в біосистемах.
11. Особливості кінетики біологічних процесів.

ЛІТЕРАТУРА

1. П.Г.Костюк, В.Л.Зима, І.С.Магура,..М.Ф.Шуба, М.С.Мірошніченко. Біофізика,-К.: Вища школа, 2001.
2. А.Б.Рубин. Биофизика, т.1.Теоретическая биофизика, -М.: Высшая школа, 2001.
3. А.Б.Коган, Н.П.Наумов, В.Г.Режабек, О.Г.Чораян. Биологическая кибернетика.-М.: Высшая школа, 1982.
4. Г.В. Стадницкий, А.І.Родионов. Экология.-М.: Высшая школа, 1998.
5. Ю.М. Романовский, Н.В.Степанова, Д.С.Чернавский. Математическое моделирование в биофизике.-М.: Просвещение, 1990.
6. Ю.І.Посудін. Фізика і біофізика навколишнього середовища.-К.: Світ, 2000.

РОЗРАХУНОК ЕНТРОПІЇ ТА ІНФОРМАЦІЇ В БІОЛОГІЧНИХ СИСТЕМАХ

1. МЕТА РОБОТИ: Поглибити теоретичні знання з термодинаміки біологічних процесів. На конкретних прикладах показати застосування другого закону термодинаміки і понять «ентропія» та «інформація» в біології.

2. ТЕОРЕТИЧНІ ВІДОМОСТІ.

2.1. ДРУГИЙ ЗАКОН ТЕРМОДИНАМІКИ І БІОЛОГІЧНІ СИСТЕМИ

За другим законом термодинаміки стан довільної системи може бути описаний особливою функцією – ентропією S . При нескінченно малих змінах стану системи зміна ентропії dS рівна або більша від поглиненої системою елементарної приведеної теплоти $\delta Q/T$:

$$dS \geq \delta Q/T \quad (1)$$

При відсутності теплообміну системи із зовнішнім середовищем $\delta Q=0$, і рівняння (1) має вигляд:

$$dS \geq 0 \quad (2)$$

Знак «більше» відноситься до необоротних процесів, а знак рівності – до оборотних.

В термодинаміці процес вважається оборотним, якщо перехід системи відбувається без зміни в навколишньому середовищі. Процес є необоротним, якщо зворотний перехід системи у вихідний стан вимагає затрати енергії ззовні.

За другим законом термодинаміки: в ізольованих системах ентропія залишається незмінною в оборотних і зростає в необоротних процесах. Максимального значення ентропія набуває в стані термодинамічної рівноваги. Ентропія – міра деградації енергії, а також міра необоротності процесу. Таким

чином, зростаюча ентропія являє собою «стрілу часу» самовільної еволюції системи.

При застосуванні другого закону термодинаміки до біологічних систем потрібно врахувати їхні особливості. По-перше, всі живі організми є відкритими системами. Їхня життєдіяльність можлива лише в умовах постійного обміну з навколишнім середовищем речовиною, енергією та інформацією. По-друге, біологічні системи принципово нерівноважні. В стані термодинамічної рівноваги, коли в системах відсутні градієнти і обмін з навколишнім середовищем, вони припиняють своє функціонування. По-третє, біологічні процеси мають необоротний характер.

Загальна зміна ентропії відкритої системи (dS) може відбуватися за рахунок зміни ентропії в самій системі внаслідок внутрішніх необоротних процесів (dS_1) і за рахунок процесів обміну системи із навколишнім середовищем (dS_0). Тобто:

$$dS = dS_1 + dS_0. \quad (3)$$

Продиференціюємо вираз (3):

$$\frac{dS}{dt} = \frac{dS_1}{dt} + \frac{dS_0}{dt} \quad (4)$$

Рівняння (4) є математичним виразом **другого закону термодинаміки** для живих організмів. *Швидкість зміни ентропії в організмі дорівнює алгебраїчній сумі швидкостей виробництва ентропії всередині організму і надходження ентропії із середовища в організм.*

Ріст і розвиток в біології супроводжується ускладненням організації і з точки зору класичної термодинаміки є самовільним зменшенням ентропії живих систем. Однак це зменшення завжди компенсується процесами в зовнішньому середовищі. Так, ріст впорядкованості фотосинтезуючих організмів з надлишком

компенсується утворенням позитивної ентропії в ядерних реакціях на Сонці. Зменшення ентропії в частині клітини, де іде біохімічний синтез, відбувається за рахунок надлишкового збільшення ентропії в інших частинах організму або середовища. Таким чином, сумарна зміна ентропії в системі: «**організм + зовнішнє середовище**» завжди *позитивна*. Звідси стає зрозумілим виникнення глобальної проблеми охорони навколишнього середовища в останні десятиріччя, коли технічна і господарська діяльність людства все відчутніше порушує екологічний баланс в природі.

Якщо

$$\frac{dS_{\bar{1}}}{dt} = - \frac{dS_{\bar{0}}}{dt} , \quad (5)$$

і при наявності обміну з середовищем параметри системи з часом не змінюються, то такий стан системи називається **стаціонарним**.

I. Пригожин на основі вивчення відкритих систем вивів основний критерій стаціонарності:

У стаціонарному стані швидкість зростання ентропії, зумовлена протіканням необоротних процесів, має позитивне і мінімальне із можливих значення:

$$\frac{dS_{\bar{1}}}{dt} > 0 \quad (6)$$

Даний принцип показує напрям еволюції відкритої системи, якщо в ній процеси протікають недалеко від рівноважного або стаціонарного стану, тобто є **лінійними**. Приклад таких явищ: клітинна проникність і активний транспорт, м'язові скорочення і процеси збудження, розвиток і ріст організмів.

Із принципу про мінімум продукції ентропії слідує, що, якщо відкрита система внаслідок зовнішніх впливів виведена із стаціонарного стану, то в ній

виникають сили, які будуть регулювати процеси таким чином, щоб система перейшла в стан з найменшою дисипацією енергії.

Живі організми є відкритими термодинамічними системами, які знаходяться в стаціонарному стані. Така постійність параметрів стану в часі, характерна для живого організму, у біології називається **гомеостазом**. Здатність біологічної системи повертатись до стаціонарного стану реалізується за допомогою специфічних *авторегулюючих* механізмів.

Розглянемо ще одну термодинамічну особливість живих систем. Індивідуальний розвиток організмів за критерієм зміни ентропії dS можна розділити на *три етапи*:

1) етап росту організму до дорослого стану, коли $dS_1 < 0$;

2) етап квазістаціонарного стану, протягом якого підтримується динамічна рівновага швидкостей деструкції і реабілітації: $dS_1 \approx 0$

3) етап старіння, коли тенденція до наростання неупорядкованості починає домінувати над процесами відновлення: $dS_1 > 0$;

Цей етап закінчується індивідуальною смертю організму, коли

$$S \rightarrow S_{\max}$$

Таким чином, живі системи повністю підкоряються **другому началу термодинаміки**. Однак, на відміну від неживих систем, вони в певні *періоди* свого розвитку мають *здатність до відновлення* і підтримання своєї структурної і функціональної організації.

2.2. Нелінійна термодинаміка необоротних процесів

Більшість процесів у біологічних системах проходять в умовах, далеких від рівноваги, коли відсутні лінійні зв'язки між швидкостями і силами. Для опису таких сильно нерівноважних процесів використовується **нелінійна термодинаміка**.

Як показано теоретично, і в умовах нерівноважності внаслідок флуктуацій можуть виникати певні *стабільні просторово - часові структури*. Такі динамічно впорядковані структури називаються **дисипативними**. Підтримання дисипативних структур досягається за рахунок неперервного *обміну* з навколишнім середовищем енергією і речовиною. Дисипативним структурам властиві критичні точки, **біфуркації**, в яких системах стає нестійкою і переходить у новий термодинамічний стан.

Дисипативні структури біологічного походження виявлені на різних рівнях організації:

- 1) молекулярному – автоколивні реакції, в тому числі з участю ферментів;
- 2) клітинному – коливання типу індукції і репресії генома, описані Жакобом і Моно;
- 3) на рівні організму – біологічні ритми;
- 4) популяційному – коливання кількості організмів у біоценозах (наприклад, система хижак – жертва).

За І.Пригожиним, дисипативні структури можуть мати значення і в *еволюційних процесах* біологічних структур. Так, походження життя може бути пов'язане з серією послідовних біфуркацій, які приводять до створення систем з підвищеною впорядкованістю.

Не виключено, як вважає Н.Рамбіді, подальший розвиток теорії нелінійних систем дозволить в майбутньому розробити на її основі нові біоелектричні пристрої для збереження і обробки інформації.

2.3. Зв'язок ентропії та інформації

Фізичну трактовку поняття ентропії вперше дав відомий фізик А.Больцман, базуючись на положеннях статистичної фізики. *Ентропія є мірою молекулярного хаосу*, і закон її наростання відображає збільшення дезорганізації системи. Ентропія кожного макроскопічного стану пов'язана з імовірністю

реалізації його через величезну кількість мікростанів. Термодинамічна імовірність (W) рівна:

$$W = \frac{N!}{N_1! \times N_2! \times N_3! \dots N_i!} \quad (7)$$

де $N = N_1 + N_2 + N_3 + \dots + N_i$ – загальна кількість молекул в системі.

N_i – кількість молекул в i -му фазовому об'ємі. Тобто, термодинамічна імовірність W – це кількість способів, якими N молекул можна розмістити в « i » комірках системи.

За формулою Планка - Больцмана ентропія системи, яка характеризується термодинамічною імовірністю W , дорівнює:

$$S = k \ln W, \quad (8)$$

де k – стала Больцмана.

Існує певний зв'язок між ентропією та інформацією. Коли дослідник отримує інформацію про дійсний стан системи, то початкова невизначеність, якою характеризувались його знання про систему, зменшується.

Згідно К. Шеннону, **інформація** – це міра тієї невизначеності, яка зникає після отримання відомостей про систему.

Для забезпечення умови адитивності необхідно, щоб кількість інформації I була логарифмічною функцією від кількості подій або мікростанів W . Для рівноімовірних подій інформація

$$I = \log_2 W. \quad (9)$$

Для підрахунку кількості інформації вибраний двійковий або бінарний код. Тобто

$$W = 2^n, \quad (10)$$

де n – кількість двійкових комірок.

Якщо система має два мікростани ($W=2$) і для отримання повної інформації достатньо одного повідомлення ($n=1$), то кількість інформації 1 біт. Така кількість інформації міститься, наприклад, у повідомленні про те, на який бік упала при киданні монета. 8 біт дорівнює 1 байту, тобто $W=256$.

Для порівняння приведемо дані про типові значення потужностей каналів при передачі технічної інформації: телеканали: 7×10^7 біт/с; телефон: 5×10^4 біт/с.

Як відомо, на всіх рівнях біологічної організації існують інформаційні системи, в яких виробляється, запасається, передається і сприймається інформація. Наприклад, інформаційна потужність органів чуття людини око:

$$3 \times 10^6 \text{ біт/с}; \quad \text{вухо: } 4 \times 10^8 \text{ біт/с.}$$

Співставлення формул (8) і (9) дає зв'язок між ентропією та інформацією:

$$S = 2,3 \cdot 10^{-24} \cdot I \quad (11)$$

Тут враховано, що $k=3,31 \times 10^{-24}$ ентропійних одиниць і $\ln W = \log_2 W \times \ln 2$.

Еквівалентність інформації I (біт) та ентропії S (Дж/К) у певному значенні схожа до еквівалентності маси і енергії за законом Ейнштейна: $E = mc^2$. Співвідношення (11) має реальний фізичний зміст – *за отриману інформацію треба платити збільшенням ентропії*. Будь-яке вимірювання пов'язане із збільшенням ентропії навколишнього середовища.

Для біологічних систем, крім кількості інформації, важливі ще й інші її характеристики. Наприклад, значимість чи цінність інформації, надлишковість, рецепція, створення нової інформації (тобто народження індивідууму) тощо.

Біологічні процеси, які протікають у живих організмах, супроводжуються істотними змінами ентропії та інформації.

3. Завдання і порядок виконання роботи

Оцінимо зміну термодинамічних параметрів для таких біологічних процесів:

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

Алгоритм задачі для оцінки «ентропійної вартості» біологічної впорядкованості складається з таких етапів:

1. Задати початкову кількість частинок N (мономерів, біомолекул, клітин). При цьому врахувати, що організм дорослої людини містить приблизно 7 кг білків і 150 г ДНК, що відповідає 3×10^{25} амінокислотним і 3×10^{23} нуклеотидним залишкам. Кількість молекул біополімерів у клітині 10^8 . У тілі дорослої людини є 10^{13} клітин.

2. Врахувати унікальність частинок, тобто, що всі вони різні, а їх відносне розміщення – своєрідне, і ні одну пару не можна поміняти місцями. У такому разі імовірність $W = N!$

3. Знайти кількість інформації I , яка відповідає даному біологічному процесу, врахувавши, що

$$I = \log_2 W = \frac{\ln W}{\ln 2} = \frac{\ln(N!)}{\ln 2} = \frac{N \times \ln N}{\ln 2} \quad (12)$$

4. Обчислити зміну ентропії процесу за формулою (11).

Стала Больцмана $k = 1,38 \times 10^{-16}$ ерг.град. $^{-1} = 1,36 \times 10^{-23}$ Дж/К = $3,31 \times 10^{-24}$ ентропійних одиниць. (1 ентропійна одиниця = 4,2 Дж/К).

5. За формулою

$$\Delta S = Cm \ln \frac{T_2}{T_1} \quad (13)$$

знайти зміну ентропії при нагріванні 200 г води від 0 до 100°C (273 і 373°K)

6. Порівняти всі отримані значення зміни ентропії ΔS . Зробити висновки про те, скільки «коштує» біологічна впорядкованість, якщо її оцінювати за допомогою цих фізичних критеріїв.

Контрольні питання

1. Класифікація термодинамічних систем. Живі організми як відкриті термодинамічні системи.
2. Перший і другий закони термодинаміки для біологічних процесів.
3. Стаціонарний стан і термодинамічна рівновага. Теорема Пригожина.
4. Зв'язок ентропії та інформації.
5. Лінійна і нелінійна термодинаміки. Дисипативні структури та біфуркаційні точки в біосистемах.
6. Особливості кінетики біологічних процесів.

ЛІТЕРАТУРА

1. П.Г.Костюк, В.Л.Зима, І.С.Магура,..М.Ф.Шуба, М.С.Мірошніченко. Біофізика,-К.: Вища школа, 2001.
2. А.Б.Рубин. Биофизика, т.1.Теоретическая биофизика, -М.: Высшая школа, 2001.
3. А.Б.Коган, Н.П.Наумов, В.Г.Режабек, О.Г.Чораян. Биологическая кибернетика.-М.: Высшая школа, 1982.
4. Г.В. Стадницкий, А.І.Родионов. Экология.-М.: Высшая школа, 1998.

5. Ю.М. Романовский, Н.В.Степанова, Д.С.Чернавский. Математическое моделирование в биофизике.-М.: Просвещение, 1990.

6. Ю.І.Посудін. Фізика і біофізика навколишнього середовища.-К.: Світ, 2000.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 3

ВИВЧЕННЯ СПЕКТРІВ ПОГЛИНАННЯ НУКЛЕЇНОВИХ

КИСЛОТ І БІЛКІВ

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

2. ТЕОРЕТИЧНІ ВІДОМОСТІ

Для вивчення фізичних і фізико-хімічних властивостей біополімерів та їхніх структурних особливостей використовуються різноманітні спектральні методи дослідження. Широкого застосування набули флуоресцентний аналіз, спектрофотометрія, лазерна спектроскопія, вивчення дисперсії оптичної активності та комбінаційного розсіювання, методи ЕПР та ЯМР.

Спектри є джерелом інформації про хімічну будову молекул та структуру їхніх енергетичних рівнів, про міжмолекулярну взаємодію, про конформації макромолекул та зміни при дії факторів зовнішнього середовища. 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 види спектрів: радіоспектри, інфрачервоні, видимі, ультрафіолетові, рентгенівські, гама-спектри.

У даній лабораторній роботі приведені загальні положення абсорбційної спектрофотометрії і деякі практичні завдання з вивчення молекулярної структури білків і нуклеїнових кислот.

2.1. ОСНОВНІ ЗАКОНОМІРНОСТІ ВЗАЄМОДІЇ СВІТЛА З РЕЧОВИНОЮ

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 λ та початковою інтенсивністю I_0 , 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 та інтенсивності I :

$$dI = k I c dl, \quad (1)$$

де k – коефіцієнт пропорційності. Після інтегрування:

$$\ln(I_0 / I) = k \cdot c \cdot l. \quad (2)$$

$$\text{Звідси:} \quad I = I_0 e^{-kCl}, \quad (3)$$

де e – основа натуральних логарифмів.

Ці рівняння є математичними виразами закону Бугера – Ламберта – Бера:

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

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

$$\lg (I_0/I) = \varepsilon \cdot c \cdot l = D , \quad (4)$$

де **D – оптична густина речовини; ε – молярний коефіцієнт поглинання,** тобто оптична густина зразка товщиною 1 см при концентрації речовини 1 моль/л.

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

Відношення $(I_0/I) = T$ називається **коефіцієнтом пропускання** .

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

Аналогічно - залежність коефіцієнту пропускання T від довжини хвилі λ є **спектром пропускання**.

Прилади, на яких вимірюють оптичну густину D або коефіцієнт пропускання T і досліджують 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:

$$E = h \nu = h c / \lambda , \quad (5)$$

де ν – частота світла;

λ – довжина хвилі світлового кванта;

c – швидкість світла у вакуумі ($c = 2,9979 \cdot 10^8 \text{ м} \cdot \text{с}^{-1}$);

h – стала Планка ($h = 6,63 \cdot 10^{-34} \text{ Дж} \cdot \text{с}^{-1}$).

Поглинені кванти збуджують електрони молекул і переводять їх із основного, незбудженого, рівня S_0 , на більш високі збуджені синглетні рівні S_1 , $S_2 \dots$ в залежності від енергії кванта.

Збуджений стан молекули є нерівноважним. Час життя збудженого синглетного рівня становить $10^{-8} - 10^{-12} \text{ с}$.

Імовірні такі шляхи подальшого перетворення поглиненої енергії:

1) теплова 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 годин.

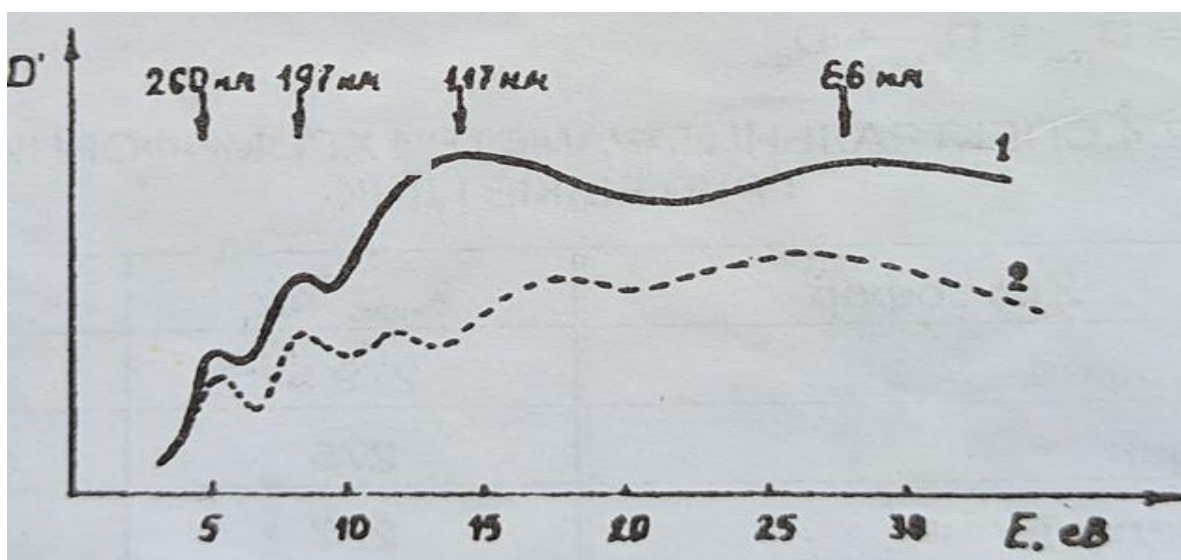


Рис.1. Поглинання нуклеїнових кислот як функція енергії кванта: 1) ДНК;

2) нуклеотиди.

2.2. ПОГЛИНАННЯ НУКЛЕЇНОВИХ КИСЛОТ І БІЛКІВ В УФ ОБЛАСТІ

Біополімери поглинають в різних областях спектру - ультрафіолетовій (УФ), видимій, інфрачервоній (ІЧ). Їхні спектри поглинання є складними, залежать від структури і властивостей молекул. В макромолекулах містяться окремі складові елементи – хромофори, які мають певні індивідуальні структурні і спектральні характеристики.

Молекули нуклеїнових кислот (НК), білків і їх складових поглинають світло ультрафіолетового діапазону спектру в середній УФ (200-300 нм) і вакуумно-ультрафіолетовій (< 200 нм) областях. На рис.1 приведена залежність поглинання ДНК і нуклеотидів від енергії квантів. Спектральні особливості НК в УФ області спектра зумовлені хромофорами – нуклеотидними основами.

Характерною властивістю цих хромофорів є наявність в них колективних, спільних для всього кільця (пуринового чи піримідинового), електронів. Це так звані π – електрони. Ще розрізняють n – і σ – електрони, які належать конкретним атомам або атомним групам. Квантово-механічні розрахунки показали, що поглинання НК у цій області визначається π - π^* та n - π – переходами в молекулах пуринових (аденін, гуанін) і піримідинових (цитозин, тимін або урацил) основ.

Основні хромоформні групи білкових молекул такі: 1) пептидна група - має смугу поглинання при 190 нм, зумовлену π - π^* - переходами; 2) карбоксильна група C=O (з поглинанням при 225 нм); залишки ароматичних амінокислот - триптофану, тирозину і фенілаланіну, які дають смуги поглинання при 229 і 280 нм (π - π^* - переходи в площині основ).

При включенні амінокислот у структуру білків їхні спектри поглинання не дуже змінюються. Можна вважати, що оптична густина білка при 280 нм є сумою оптичних густин окремих амінокислот:

$$D_{\text{білка}} = D_{\text{три}} + D_{\text{тир}} + D_{\text{фа}}$$

2.4. СПЕКТРАЛЬНІ ПАРАМЕТРИ ХРОМОФОРНИХ ГРУП БІЛКІВ І ДНК

№	Хромофор	$\lambda_{\text{макс}}$, нм	$\epsilon_{\text{макс}}$, $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$
1	Триптофан	279,5	$5,6 \cdot 10^3$
2	Тирозин	275	$1,38 \cdot 10^3$
3	Фенілаланін	257	$1,8 \cdot 10^3$
4	Аденін	260	$13,4 \cdot 10^3$
5	Урацил	260	$8,2 \cdot 10^3$
6	Тимін	260	$7,4 \cdot 10^3$
7	Гуанін	260	$7,2 \cdot 10^3$
8	Цитозин	260	$5,55 \cdot 10^3$

3. ПРИНЦИП РОБОТИ І ОПТИЧНА СХЕМА СПЕКТРОФОТОМЕТРА

Спектрофотометр призначений для вимірів оптичної густини D і коефіцієнту пропускання T в області від 200 до 1200 нм. При дослідженнях у видимій та інфрачервоній 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. Принцип роботи спектрофотометра – вимірювання відношення двох світлових потоків: потоку, який пройшов через досліджуваний зразок, і потоку, падаючого (або того, що пройшов через еталонний зразок, наприклад, повітря).

Оптична схема приладу – автоколімаційна (рис. 2). Світло від джерела 1 або 1' попадає на дзеркальний конденсор 2, який направляє його на плоске дзеркало 3. Дзеркало відхиляє пучок променів на кут 90° | 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 описана в лабораторній інструкції.

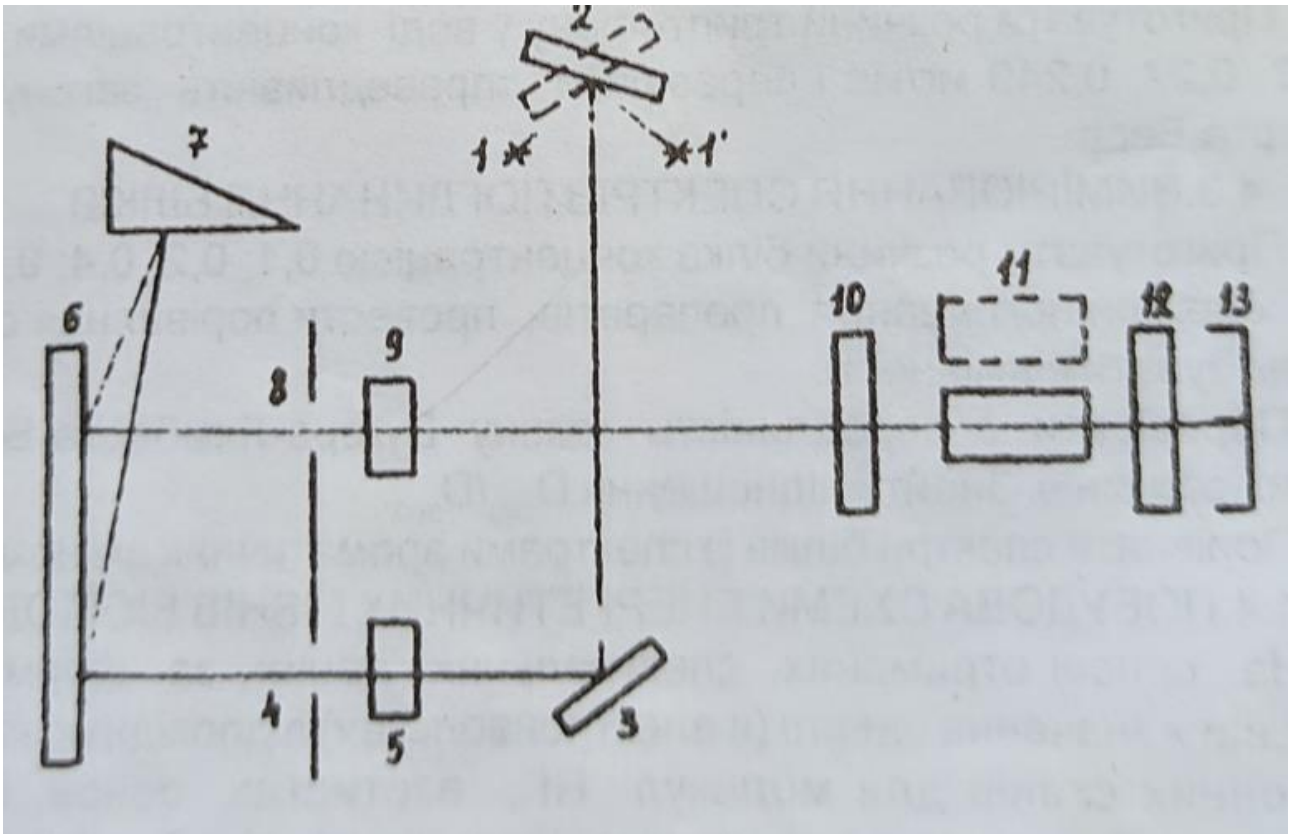


Рис.2. Оптична схема спектрофотометра СФ.

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. Виміряти оптичну густину розчину НК при 260 нм у кварцевих прямокутних кюветах відносно розчинника. Розбавити розчин таким чином, щоб його оптична густина була 0,5-0,6. Зняти 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 λ , 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.

Приготувати водні розчини амінокислот таких концентрацій: триптофану - 0,0147 мг/мл; тирозину - 0,053 мг/мл; фенілаланіну – 0, 352 мг/мл.

Дослідити спектри поглинання цих розчинів від 210 до 320 нм. За отриманими значеннями оптичної густини при $\lambda = 250$ нм і $\lambda = 280$ нм розрахувати молярний коефіцієнт поглинання амінокислот.

Молярна маса триптофану – 204, тирозину – 181, фенілаланіну –165.

Приготувати розчини триптофану у воді концентраціями 0,00735; 0,0147; 0,22; 0,249 мг/мл і перевірити справедливість закону Бугера-Ламберта-Бера.

4.3. ВИМІРЮВАННЯ СПЕКТРІВ ПОГЛИНАННЯ БІЛКІВ

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-Лямберта-Бера для білкових розчинів. Знайти відношення D_{280}/D_{260} D_{280}/D_{260} .

Порівняти спектри білків із спектрами ароматичних амінокислот.

4.4. ПОБУДОВА СХЕМИ ЕНЕРГЕТИЧНИХ РІВНІВ БІОМОЛЕКУЛ

На основі отриманих спектральних даних за формулою (5) розрахувати значення енергії (в електрон-вольтах) 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.

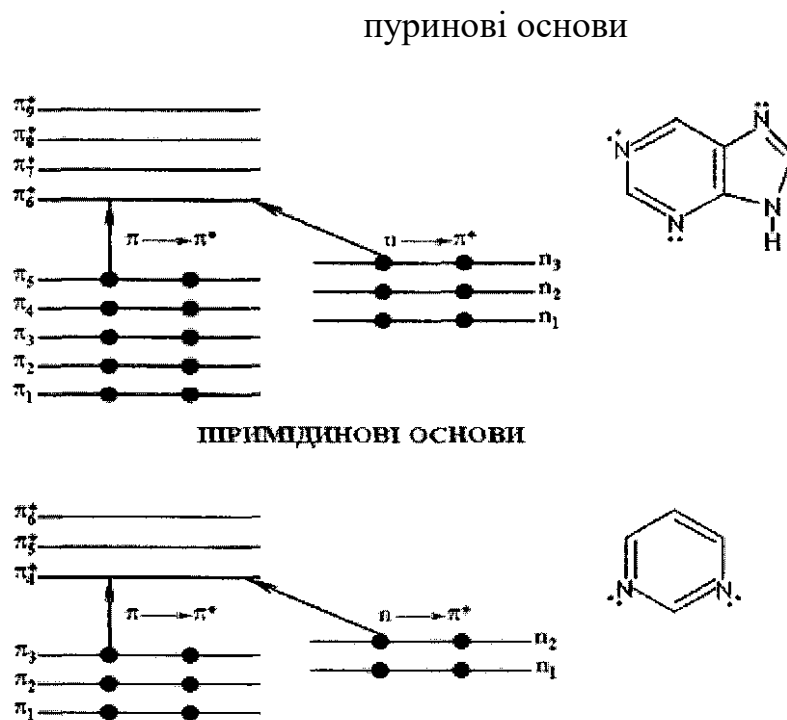
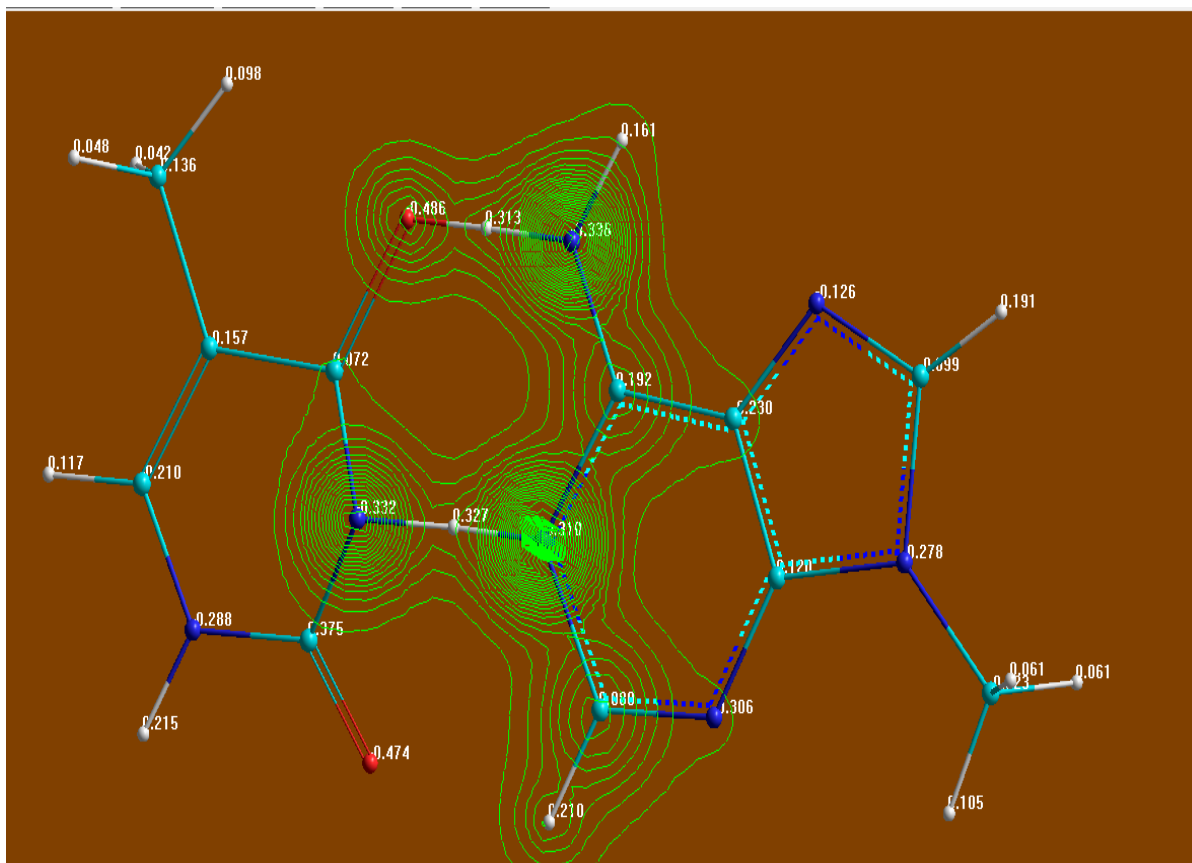


Рис. 3.Схематичне зображення рівнів пуринових та піримідинових основ

Розподіл електростатичного потенціалу в комплексі тимін-аденін



КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ

1. Яку інформацію можна отримати за допомогою спектральних методів?
2. Основний закон фотобіофізики.
3. Закон Бугера – Ламберта – Бера.
4. Що таке спектр поглинання, спектр пропускання?
5. У якій спектральній області поглинають білки, нуклеїнові кислоти?
6. Хромофори у біополімерах.
7. Принцип роботи спектрофотометра.
8. Квантова біофізика. Енергетичні рівні молекул. Схема Яблонського.
9. Механізми міграції енергії у біоструктурах. Значення збуджених станів молекул та міграції енергії в біосистемах.

ЛІТЕРАТУРА

1. П.Г.Костюк та інші. Біофізика. – К.: Вища школа, 2001.
2. А.Б.Рубин. Биофизика, - М.: Высшая школа, 2001.
3. М.В.Волькенштейн. – М.: Наука, 1998.
4. Физические методы исследования белков и нуклеиновых кислот. Под ред. Ю.С.Лазуркина.-М.: Наука, 1967.
5. Э.Н.Трифонов, М.Д.Франк-Каменецкий, Ю.С.Лазуркин. Структура и генетические функции биополимеров, - М.: 1973.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 4

ДОСЛІДЖЕННЯ ФАЗОВИХ ПЕРЕХОДІВ У СТРУКТУРІ БІОПОЛІМЕРІВ

1. МЕТА РОБОТИ: Поглибити теоретичні знання про фізичну структуру молекул біополімерів; засвоїти методи дослідження просторових конформацій біомолекул

2. ТЕОРЕТИЧНІ ВІДОМОСТІ

2.1. ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА СТРУКТУРИ БІОПОЛІМЕРІВ

Унікальні функції таких важливих біополімерів, як нуклеїнові кислоти і білки, зумовлені їхньою специфічною хімічною будовою і просторовою організацією.

Біомакромолекули характеризуються строго визначеною послідовністю мономерів, з'єднаних ковалентними зв'язками. *Кількість і взаємне розміщення мономерів у цій послідовності становлять первинну структуру біополімерів.*

Первинна структура нуклеїнових кислот - це послідовність *нуклеотидів* в полінуклеотидному ланцюгу, Нуклеотиди складаються із фосфату, вуглеводу (дезоксирибози або рибози) і азотистих основ. Піримідинові основи: тимін, урацил, цитозин. Пуринові основи: аденін, гуанін. Кількість нуклеотидів в біополімері - від 10^3 до 10^8 .

Первинна структура білків - послідовність *амінокислотних залишків*, з'єднаних пептидними зв'язками.

Зараз розроблені різні прийоми секвенування - розшифровки первинної структури біополімерів. Вони базуються на фізико-хімічних, фізичних і математичних методах дослідження з широким застосуванням комп'ютерів.

Важливою особливістю структури біополімерів є стабілізація

положення хімічних груп у просторі і утворення конформації з мінімальною внутрішньою енергією. Регулярне розміщення у просторі пептидних груп у білках та азотистих основ у нуклеїнових кислотах створює **вторинну структуру біополімерів**.

Вторинна структура ДНК - це подвійна спіраль, стабілізована водневими зв'язками між комплементарними парами азотистих основ і стекінг - взаємодією основ по вертикалі (рис.1). Діаметр спіралі 2 нм. Така модель вторинної структури ДНК була запропонована у 1953 році Дж.Уотсоном і Ф.Кріком на основі даних рентгеноструктурного аналізу, моделювання і закономірностей Чаргаффа.

Основні типи **вторинної структури білкових молекул**: α -спіраль

і β -структура, утримувані водневими зв'язками.

Термодинамічно вигідне розміщення у просторі елементів вторинної структури біополімерів утворює **третинну структуру**. Основну роль при цьому відіграють слабкі взаємодії: водневі, електростатичні та гідрофобні зв'язки, ван-дер-ваальсові взаємодії.

Четвертинна структура - просторове розміщення кількох компактно організованих полімерних ниток (субодиниць) з утворенням надмолекулярного комплексу. Дана структура формується за допомогою слабких взаємодій.

Третинна і четвертинна структури ДНК - це суперспіральні структури в хроматині ядер - *хроматосома* (діаметр витків 10 нм) і *нуклеосомний соленоїд* (діаметр 30 нм). Динаміка макромолекули внаслідок обертання атомних груп навколо одинарних ковалентних зв'язків викликає виникнення різних поворотних ізомерів або конформацій полімерного ланцюга.

Конформація макромолекули - спосіб укладки полімерного ланцюга (без розриву ковалентних зв'язків) за рахунок утворення великої кількості слабких

зв'язків. Внаслідок цього формується найбільш термодинамічно вигідна і стабільна просторова структура полімера.

Ще одна важлива особливість молекул, які синтезуються у живій клітині, - їхня *стереоспецифічність* (хіральність). Стереоспецифічні молекули можуть існувати у виді двох дзеркально симетричних форм -стереоізомерів: правої (D-форма) і лівої (L-форма). Природні ДНК належать до правої подвійної спіралі (В- і А- конформації). При певних умовах виявлений перехід правої В-конформації в Z-конформацію, яка є лівою спіраллю. У білках найбільш часто зустрічається і є енергетично вигідною *права α -спіраль*. Її модель вперше була постульована Л.Полінгом і Р.Корі в 1951 році.

2. 2. СИЛИ І ЗВ'ЯЗКИ, СТАБІЛІЗУЮЧІ СТРУКТУРУ МАКРОМОЛЕКУЛ

Ковалентні зв'язки в первинній структурі біомолекул достатньо стійкі. Вільна енергія їх утворення 200-800 кДж моль⁻¹. Серед слабких взаємодій найбільшу енергію має водневий зв'язок.

Водневий зв'язок- це донорно-акцепторний зв'язок між полярними групами, які містять атом водню (O-H, N-H, S-H), і атомами O, N, S. Енергія водневих зв'язків - 4-30 кДж моль⁻¹. Квантово-механічні розрахунки показали, що поряд з електростатичною взаємодією, певний вклад в енергію водневих зв'язків вносить дисперсійна взаємодія між атомами.

Енергія **електростатичної взаємодії** W_e , між зарядженими групами в молекулі рівна:

$$W = \frac{1}{4\pi\epsilon\epsilon_0} \frac{q_1q_2}{r}$$

де q_1 , і q_2 - електричні заряди груп; r - віддаль між зарядженими групами; ϵ - діелектрична стала; ϵ_0 - $8,85 \cdot 10^{-12}$ КлВ⁻¹м⁻¹.

Ці сили проявляються на значних віддальях між групами, їхні енергії становлять 40-400 кДж моль⁻¹.

Найбільш близькодійучі сили - це **ван-дер-ваальсові взаємодії**, які є трьох видів:

а) *Дисперсійні* - між неполярними групами. Енергія дисперсійної взаємодії $W_{\text{дис}}$:

$$W_{\text{дис}} = -\frac{3}{2} \frac{I_1 I_2}{I_1 + I_2} \frac{\alpha_1 \alpha_2}{\epsilon r^6}$$

де: I_1 і I_2 - потенціали іонізації груп; α_1 і α_2 - поляризованість груп.

Енергія дисперсійних зв'язків: 4 - 40 кДж моль⁻¹.

б) Взаємодії між полярними групами, *диполями*, з енергією W_{gg} :

$$W_{gg} = \frac{1}{6\pi\epsilon_0 k_0 T} \frac{\mu_1^2 \mu_2^2}{\epsilon r^6}$$

де μ_1^2 і μ_2^2 , -- дипольні моменти; T - абсолютна температура, k_0 - стала Больцмана.

в) Постійний диполь може індукувати дипольний момент в сусідній неполярній групі, завдяки чому виникають взаємодії типу *диполь-індукований диполь* з енергією:

$$W_{g\mu} = \frac{1}{2\pi\epsilon_0} \frac{\alpha_1 \mu^2}{\epsilon r^6}$$

де μ - постійний диполь.

Енергії цих взаємодій W_{gg} і $W_{g\mu}$ лежать у межах від 0,4 до 4 кДж моль⁻¹.

У живих клітинах біомолекули функціують у водному середовищі. Тому взаємодія мономерів з молекулами води істотно впливає на конформацію біополімера в цілому. Полярні групи макромолекули є гідрофільними. Вони легко взаємодіють з молекулами води з утворенням водневих або диполь-дипольних зв'язків. Неполярні групи у водному середовищі утворюють асоціати, щоб зменшити контакти з полярними молекулами води. Це так звані *гідрофобні взаємодії*, в основі яких лежить зміна структури води в присутності неполярних молекул. Біля неполярних груп зменшується рухливість молекул води, зростає кількість їх упорядкованих кластерних структур. Енергії гідрофобних взаємодій лежать в межах від 4 до 9 кДж моль⁻¹.

При кімнатній температурі енергії слабких зв'язків достатні для стабілізації конформації макромолекули, оскільки середня теплова енергія молекул $W_T = 2,5$ КДж моль⁻¹. Зміна параметрів середовища викликає конформаційну перебудову молекули з утворенням нової, стабільної для даних умов, конформації.

2.2. ФАЗОВІ ПЕРЕХОДИ В БІОПОЛІМЕРАХ

Знання фізичної природи сил, які визначають стабільну конформацію полімерів, дозволяє зрозуміти механізми дії факторів середовища (фізичних, хімічних) на структуру і функцію біомакромолекул. |

Нуклеїнові кислоти і білки під дією кислот, лугів, спиртів, при нагріванні чи опроміненні змінюють свою просторову структуру, можуть денатуруватись. **Процес денатурації** полягає у розходженні нуклеотидних ниток подвійної спіралі ДНК або спіральних ділянок РНК чи білків, У ДНК причиною його є розриви водневих зв'язків між комплементарними парами основ і порушення вертикальної стекінг - взаємодії. Це процес внутрімолекулярного плавлення, фазовий кооперативний перехід спіраль- клубок. Він супроводжується різкою зміною фізичних характеристик макромолекули: зменшенням в'язкості, оптичної активності, зростанням поглинання в області ультрафіолету. Плавлення структури ДНК вперше було виявлено в 1957 році (роботи Doty).

Молекула ДНК - унікальний приклад одновимірної впорядкованої структури з аперіодичним розміщенням ланок. До таких структур можна застосувати термодинамічні поняття "фаза" і "фазовий перехід".

Фаза - це фізично однорідна частина системи, фізичні властивості якої відрізняються від інших її частин. Приклади фаз у фізиці – агрегатні стани речовини. На межі стику різних фаз спостерігається перехід деякої кількості речовини із однієї фази в іншу. Такі процеси називаються фазовими переходами або перетвореннями. Фазові перетворення можуть супроводжуватися поглинанням або виділенням деякої кількості теплоти. Це фазові переходи

першого роду. Фазові переходи другого роду відбуваються без теплового обміну з середовищем. У точці переходу першого роду ентропія і внутрішня енергія змінюються стрибком. При переходах другого роду теплоємність змінюється стрибком, а внутрішня енергія - неперервно.

Теоретично і експериментально показано, що температурні криві переходу в біополімерах відповідають фазовим переходам першого роду. Хоч, на відміну від плавлення кристалів, у них немає різкої зміни термодинамічних функцій: вільної енергії і ентропії -- внаслідок гетерогенності та малих розмірів. Разом з тим, різка зміна теплоємності при переході схожа на перехід другого роду.

Від конформації ДНК залежать оптичні властивості хромофорних груп. При денатурації оптична густина молекули при 260 нм, збільшується приблизно на 30% (рис.1). Це явище називається гіперхромним ефектом.

Теплова денатурація ДНК проходить у вузькому інтервалі температур і супроводжується гіперхромним ефектом. Залежність оптичної густини D при 260 нм від температури називається **кривою плавлення ДНК**. Із кривих плавлення визначають такі важливі параметри, як інтервал плавлення і температуру плавлення $T_{пл}$.

Інтервал плавлення ΔT - це різниця температур, при яких дотична в точці найбільшої крутизни кривої плавлення перетинає верхній і нижній рівні поглинання.

Температура переходу $T_{пл}$ (температура плавлення) - це значення температури, яке відповідає половині максимального приросту оптичної густини D .

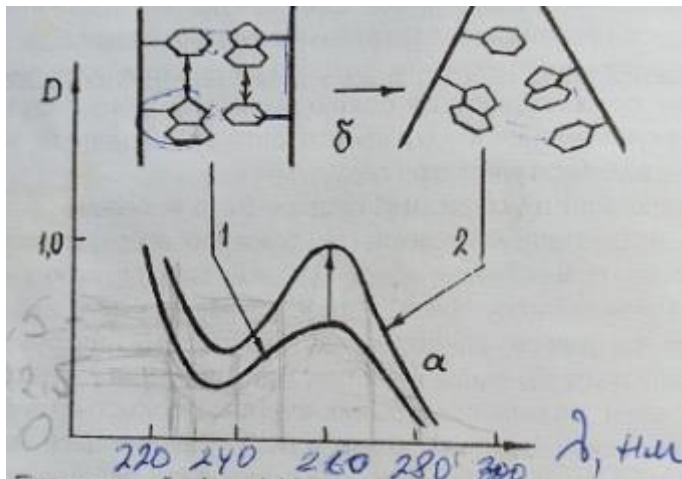


Рис.1. Гіперхромний ефект (а) і структурні перебудови (б) ДНК: 1-нативна;
2-денатурована ДНК

Температура і інтервал плавлення характеризують ступінь впорядкованості та гетерогенності макромолекул. Препарати нуклеїнових кислот, виділені із різних організмів і клітин, мають різні температури плавлення. Експериментально показано, що $T_{пл}$ лінійно залежить від кількості (X) гуанін-цитозинових (ГЦ) пар ДНК:

$$T_{пл} = T_{ат} + (T_{гц} - T_{ат})X$$

де $T_{ат}$ – температура плавлення АТ-пар,

$T_{гц}$ – температура плавлення ГЦ – пар.

Гетерогенність складу ДНК є причиною тонкої структури кривих плавлення, виявленої методом диференціальної спектрофотометрії.

Крива плавлення чутлива до наявності в розчині речовин, здатних зв'язуватися з ДНК. Наприклад, до іонів водню (тобто рН середовища), іонів металів, молекул барвників, деяких антибіотиків, нуклеотидів, РНК.

При охолодженні нагрітих препаратів нуклеїнових кислот оптична густина зменшується – спостерігається гіпохромний ефект. Відновлення комплементарної структури біополімерів при припиненні дії денатуруючого агента називається ренатурацією. При цьому може частково відновлюватися і біологічна активність.

Важливими параметрами є швидкість і час переходу спіраль-клубок. Показано, що якби розплітання ниток ДНК відбувалося лише під впливом броунівського руху при кімнатній температурі, то для ДНК з молекулярною вагою $3 \cdot 10^6$ потрібно було б 150 днів. У живій клітині при транскрипції і редуплікації такий процес проходить з участю ферментів за кілька днів. Швидкість переходу спіраль-клубок оцінюють за допомогою *кінетичних кривих плавлення*.

Кінетична крива плавлення ДНК відображає залежність ступеню деспіралізації вторинної структури від часу (див. рис.2).

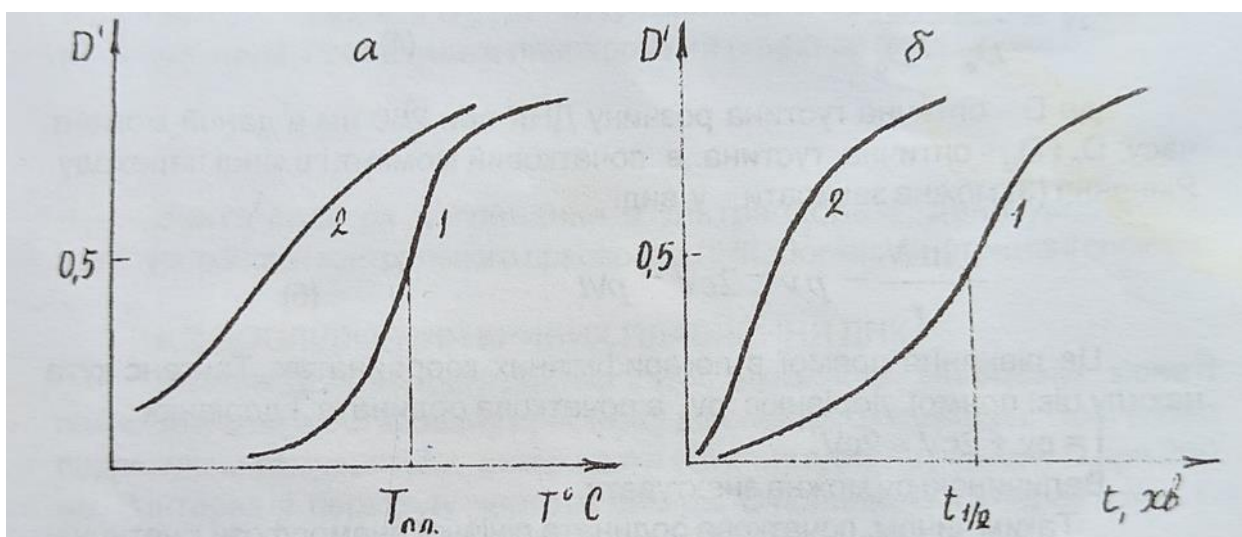


Рис.2. Криві плавлення (а) і кінетичні криві (б) ДНК: 1 – нативна, 2 – денатурована ДНК.

2.4. ВИЗНАЧЕННЯ СТУПЕНЯ СПІРАЛЬНОСТІ ПОЛІНУКЛЕОТИДІВ

Величина гіперхромного ефекту пропорційна кількості нуклеотидів, які знаходяться у спіральних ділянках. На залежності інтервалу і температури плавлення від їх кількості базується термодинамічний метод визначення дефектів вторинної структури ДНК. Згідно теорії

$$C = A [(\Delta T)^2 - (\Delta_0 T)^2], \quad (2)$$

Де C – концентрація дефектів, ΔT і $\Delta_0 T$ – ширина інтервалів плавлення еталонної ДНК і РНК з дефектами, A – константа, визначається при градуюванні.

Під концентрацією дефектів C розуміють відношення кількості локально розплетених ділянок ДНК до загальної кількості пар основ, які входять у спіральні ділянки. За допомогою термодинамічного методу можна визначити один дефект на 10^3 пар нуклеотидів.

Чутливішим є кінетичний метод вимірювання кількості денатурованих ділянок. Вивчення кінетики розплітання ниток ДНК у присутності денатуруючих агентів (підвищена температура, формальдегід) дає змогу точніше оцінити початкову кількість дефектів C вторинної структури макромолекул. Теоретичний розрахунок приводить до такого рівняння кінетичної кривої:

$$N = e^{-(p\nu+2cv)t-p\nu t^2} \quad (3)$$

де N – ступінь спіральності в момент часу t ; ν – кількість нуклеотидних пар в деспіралізованій ділянці молекули; p і V – швидкість появи і росту деспіралізованих ділянок. Ступінь спіральності N визначається формулою:

$$N = \frac{D_m - D}{D_m - D_0} \quad (4)$$

де D – оптична густина розчину ДНК при 260 нм в даний момент часу; D_0 і D_m – оптична густина в початковий момент і в кінці переходу. Рівняння (3) можна записати у виді:

$$-\frac{\ln N}{t} - pv - 2cV - pVt \quad (5)$$

Це рівняння прямої в логарифмічних координатах. Тангенс кута нахилу цієї прямої дорівнює pv , а початкова ордината $|$ дорівнює:

$$|l = pv + 2cV \approx 2cV.$$

Величиною pv можна знехтувати.

Таким чином, початкова ордината лінійної анаморфози кінетичної кривої пропорційна концентрації дефектів вторинної структури.

$$c = \frac{l}{2V} \quad (6)$$

Для знаходження C можна використати й інший параметр кінетичної кривої – час $t_{1/2}$ половинного перетворення структури ДНК при взаємодії з формальдегідом. Теоретично показано, що

$$c \approx \left(1 - \frac{t_{1/2}}{t_{1/2}^0}\right) \sqrt{\frac{p}{v} \ln 2} \quad (7)$$

де $t_{1/2}^0$ – час половинного плавлення еталонного препарату ДНК.

3. ОПИС ЛАБОРАТОРНОГО ОБЛАДНАННЯ

Визначення гіперхромного ефекту, дослідження кривих плавлення і кінетичних прямих проводиться спектральним методом за допомогою спектрофотометра СФ. Будова і принцип роботи спектрофотометра приведені у відповідному розділі лабораторної роботи №3.

4. ЗАВДАННЯ І ПОРЯДОК ВИКОНАННЯ РОБОТИ

4.1. ВИВЧЕННЯ ГІПЕРХРОМНОГО ЕФЕКТУ В ДНК

Підготувати 6-7 мл розчину ДНК концентрацією 25-30 мкг/мл в буферному розчині. Виміряти оптичну густину розчину ДНК D при 260 нм. Розчин розлити в дві пробірки з притертими пробками. Пробірки опустити в гарячу воду на 10-15 хв. Після цього одну пробірку опустити в лід, а іншу залишити у водяній бані, яка поступово охолоджується до кімнатної температури. Виміряти D_{260} денатурованої ДНК (швидко охолодженої) і ренатурованої. Розрахувати гіперхромний ефект за формулою:

$$E_{\phi} = \frac{D_{\text{денат}} - D}{D}$$

Зняти спектри поглинання в ультрафіолеті денатурованого, ренатурованого і контрольного препаратів ДНК. Порівняти отримані спектри.

4.2. ДОСЛІДЖЕННЯ КРИВИХ ПЛАВЛЕННЯ ДНК

Розчин ДНК концентрацією 25-30 мкг/мл у кварцевій кюветі помістити в термостатовану приставку до спектрофотометра. Поступово підвищуючи температуру, вимірювати оптичну густину розчину D при 260 нм. В інтервалі переходу частота вимірів D повинна бути через кожні 1-2⁰. Аналогічні виміри провести для денатурованої ДНК.

За отриманими даними зобразити в координатах [D_{260} , $T^{\circ}\text{C}$] криву плавлення, визначити температуру ($T_{\text{пл}}$) і ширину інтервалу плавлення. За формулою (2) оцінити кількість дефектів C вторинної структури біополімерів.

За формулою

$$X = 2,44 T_{\text{пл}} - 83,4 (\%)$$

підрахувати кількість ГЦ – пар в ДНК.

4.3. ВИВЧЕННЯ КІНЕТИКИ ФАЗОВОГО ПЕРЕХОДУ СПІРАЛЬ-КЛУБОК

Приготувати розчин ДНК (25-30 мкг/мл) з добавкою формальдегіду. Препарати помістити в термостатовану приставку при температурі 54⁰С. Через кожні 2-3 хв. вимірювати оптичну густину розчину при 260 нм. Побудувати кінетичну криву і її лінійну анаморфозу. Визначити час половинного плавлення $t_{1/2}$. Аналогічні виміри провести для денатурованої ДНК.

За формулами (6) і (7) оцінити кількість дефектів С у вторинній структурі біополімеру. Порівняти значення С, отримані термодинамічним і кінетичним методами.

КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ

1. Молекулярна біофізика – визначення, об'єкти дослідження, методи, завдання і сучасні проблеми.
2. Загальна характеристика структури і функції біополімерних молекул.
3. Типи взаємодії та енергії зв'язків у біомакромолекулах.
4. Що таке денатурація і ренатурація? Природа гіперхромного ефекту.
5. Криві плавлення, кінетичні криві, їх основні параметри.
6. Термодинамічний і кінетичний методи визначення кількості денатурованих ділянок в ДНК.
7. Переходи «спіраль-клубок» в біополімерних молекулах як приклади фазових переходів.
8. Динаміка білкових молекул. Проблема молекулярного впізнавання. Механізми ферментивного каталізу. Редуплікація, транскрипція, трансляція. Генетична інженерія.

ЛІТЕРАТУРА

6. П.Г.Костюк та інші. Біофізика. – К.: Вища школа, 2001.
7. А.Б.Рубин. Биофизика, - М.: Высшая школа, 2001.
8. М.В.Волькенштейн. – М.: Наука, 1998.
9. Физические методы исследования белков и нуклеиновых кислот. Под ред. Ю.С.Лазуркина.-М.: Наука, 1967.
- 10.Э.Н.Трифонов, М.Д.Франк-Каменецкий, Ю.С.Лазуркин. Структура и генетические функции биополимеров, - М.: 1973.

РЕКОМЕНДОВАНІ ДЖЕРЕЛА ІНФОРМАЦІЇ

Основна 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. Зима В.Л. Збірник задач з біофізики. – К.: Вища школа, 2001.- 124 с.
4. Личковський Е.І. та ін. Біофізика. Фізичні методи аналізу та метрологія. – Вінниця.: Нова книга, 2014. – 464 с.
5. Посудін Ю.І. Біофізика і методи аналізу навколишнього середовища. – К.: Printline, 2013. – 354 с.
6. Тиманюк В. А., Животова Е. Н. Биофизика.– Х.: НФАУ, 2003. – 704 с.
7. Рубин А. Б. Биофизика, в 2 т.– М.: Кн. дом Университет, 2000. – 917 с.
8. Гродзинський Д.М. Радіобіологія. - К.: Либідь, 2001. - 448 с.
9. Yu.I.Posudin. Measuring environmental parameters.- WILEY, 2014. - 429 p.
10. Кучеренко М.С. та ін. Біохімія. – К.: ВПЦ КНУ, 2002. – 480 с.
11. Шафраньош І.І., Суховія М.І., Шафраньош М.І. Фізичні поля і живі організми. (підручник для студ. спец. «Біомедична інженерія»). - Ужгород: Вид. УжНУ, «Говерла», 2021. –213 с.
12. Суховія М.І., Шафраньош М.І., Шафраньош І.І., Методи медико-біологічних досліджень. (навч. посібник для студ. спец. «Біомед. інж.»). - Ужгород: Вид. УжНУ, «Говерла», 2021. – 45 с.
13. Суховія М.І., Шафраньош І.І. Молекулярна біофізика. (навч.-мет. пос. для студ. спец. «Біомед. інж.»).. - Ужгород, 2022. – 34 с.

14. Суховія М.І., Шафраньош І.І. Біофізика складних систем. (навч.-мет. пос. для студ. спец. «Біомед. інж.»).. - Ужгород, 2022. – 36 с.
15. Гонський Я.І. , Максимчук Т.П. Біохімія людини.- Тернопіль, Укрмедкнига, 2001. – 736 с.
16. Губський Ю.І. Біологічна хімія.- Тернопіль. Укрмедкнига, 2001. – 506 с.
17. Владимиров Ю. А., Потапенко А. Я. Физико-химические основы фотобиологических процессов. – М. : Высш. шк., 1989. – 199 с.
18. Лопушанський Я. Збірник задач і запитань з медичної і біологічної фізики.– Львів: НТШ ім. Шевченка, 2010. – 584 с.
19. Ємчик Л., Кміт Я. Медична біофізика. Львів: НТШ ім. Шевченка, 1998. = 250 с.
20. Ремизов А. Н. и др. Медицинская и биологическая физика. – М.: Дрофа, 2010. – 558 с.
21. Физические методы исследования белков и нуклеиновых кислот.(под ред. Лазуркина Ю.С.). - М.; Наука, 1987. – 324 с.

Додаткова література

1. Крик Ф. Двойная спираль. – М.: Мир, 1991. – 287 с.
2. Рыбин И. А. Лекции по биофизике. – Свердловск : Изд-во Урал. унив., 1990. – 240 с.
3. Шредингер Э. Что такое жизнь с точки зрения физики. – М.: Римис, 2009. – 176 с.
4. Современные методы биофизических исследований, (под ред. А.Б. Рубина), М.: Высшая школа, 1988. - 376 с.
5. Антонов В. Ф. и др. Физика и биофизика. - М: ГЭОТАР, Медиа, 2009. – 480 с.

6. Волькенштейн М. В. Биоп физика. – М.: Наука, 1981. – 576 с.
7. Губанов Н.И., Утепбергенов А.А. Медицинская биоп физика. – М.: Медицина, 1987. – 398 с.
8. 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.
9. I.I. Shafranyosh, M.I. Sukhoviya. Inelastic collisions of the uracil molecules with electrons //J. Chem. Phys. 2012.- V. 137, p. 184303-18430.
10. Посудин Ю.И. Лазерная фотобиология. - К.:Вища школа, 1989. - 303с.
- 11.Блюменфельд А.А. Проблемы биологической физики. - М.: Наука, 1974. - 398 с.
- 12.Владимиров Ю..А. и др. Биоп физика. - М.: Медицина, 1983.- 272 с.
- 13.Посудін Ю.І. Фізика з основами біофізики. - К.: Світ, 2003. – 399 с.
- 14.Эссаулова И.А. и др. Руководство к лабораторным работам по медицинской и биологической физике. – .М.: Высш.шк., 1987. – 271 с.
- 15.Статті в наукових біофізичних і фізичних журналах. Ресурси Інтернету.

З М І С Т

ВСТУП.....	4
1. ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 1	
МАТЕМАТИЧНЕ МОДЕЛЮВАННЯ БІОЛОГІЧНИХ	
ПРОЦЕСІВ.....	7
2. ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 2	
РОЗРАХУНОК ЕНТРОПІЇ ТА ІНФОРМАЦІЇ В БІОЛОГІЧНИХ	
СИСТЕМАХ.....	16
3. ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 3	
ВИВЧЕННЯ СПЕКТРІВ ПОГЛИНАННЯ НУКЛЕЇНОВИХ	
КИСЛОТ І БІЛКІВ.....	28
4. ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 4	
ДОСЛІДЖЕННЯ ФАЗОВИХ ПЕРЕХОДІВ У СТРУКТУРІ	
БІОПОЛІМЕРІВ.....	37
5. РЕКОМЕНДОВАНІ ДЖЕРЕЛА	
ІНФОРМАЦІЇ.....	39
6. ЗМІСТ.....	47

Формат 60×84/16. Умовн. друк. арк. Зам. № Наклад 50 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.*