

Харківський державний університет

На правах рукопису

Левчук Юрій Миколайович

**Фотон-кореляційна спектроскопія рідких
біологічних систем**

Спеціальність 01.04.25 – біофізика

Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня
доктора фізико-математичних наук

Харків - 1995

Дисертацією є рукопис

Робота виконана в Інст
Академії наук України

ЛНБ України ім.В.Стефаніка



00761313 (L)

льної

Офіційні опоненти:

1. Доктор фізико-математичних наук, професор
Леонід Федорович Суходуб
2. Доктор фізико-математичних наук, професор
Михайло Васильович Курик
3. Доктор біологічних наук
Світлана Михайлівна Кочубей

Провідна організація: Національний університет
ім. Тараса Шевченка

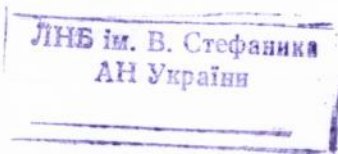
Захист відбудеться « 8 » грудня 1995 р. на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 02.02.13 Харківського державного університету: 310077, м.Харків, пл.Свободи, 4, ауд. 7-4.

З дисертацією можна ознайомитися у Центральній науковій бібліотеці Харківського державного університету.

Автореферат розісланий « 4 » листопада 1995 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради

С.В.Гаташ



ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність проблеми. Феномен органічного життя, який може виникнути лише на певному рівні структурування речовини, був залишається поки ще досить загадковим явищем Природи. Вражаючи успіхи фізико-хімічної біології і біофізики не тільки дозволили дати відповідь на числені принципи і складні питання, але і поставили чимало нових завдань. Традиційний підхід природничих наук — першочергове вивчення будови об'єкту. І біологічні об'єкти не стали винятком із цього правила. Таким чином, більшість досліджень біологічних систем, особливо молекулярного рівня, є дослідженнями структури. Відомо, що кінцевою метою наукового аналізу є не тільки встановлення властивостей об'єкту, але також здобуття можливості передбачення поведінки об'єкту у змінених умовах і, нарешті, одержання можливості управління об'єктом, що вивчається. Такі задачі були розв'язані для значної кількості неживих субстанцій, де кореляції «будова-властивості» виявились досить надійними і однозначними. Та коли підійшла черга складних біологічних систем, виявилось, що передбачити їх властивості (функцію), спираючись лише на дані про структуру, практично неможливо. Отже на сьогоднішній день міст «структура-функція» поки що не збудований. Тим часом значення такого роду кореляцій (якщо їх взагалі можливо побудувати) настільки очевидне, що не потребує додаткового коментаря. Головною причиною, що стримує просування вперед на цьому багатообіцяючому шляху пошуків, є недостатнє врахування динамічного стану суб'єктів життєдіяльності. Зараз стало ясно, що всім без винятку біологічним об'єктам від молекулярного до клітинного рівня притаманна специфічна багатомодова релаксаційна динаміка, без врахування і аналізу якої неможливо зрозуміти дії тієї чи іншої біологічної системи. Наприклад, успіхи білкової інженерії доводять, що немає перешкод принципового характеру для конструювання нових форм білкових молекул із певними структурними властивостями. Але для створення білків із заданими функціональними характеристиками необхідне з'ясування природи процесів, що запезпечують виконання структурою специфічної функції. І ці ключові процеси в значній мірі визначаються динамічними властивостями білкових макромолекул. Можна із впевненістю сказати, що вивчення тонких деталей будови біологічних об'єктів і пара-

метрів внутрішньої динаміки являє головний напрям, на якому зосереджені зусилля сучасної фізико-хімічної біології і біофізики.

Актуальність цих завдань стимулювала не тільки залучення для їх вирішення новітніх фізичних методів дослідження, але також появу наукових розробок загальнотеоретичного і концептуального плану.

Незважаючи на постійне зростання кількості і рівня експериментальних робіт даного наукового напрямку, загальноновизнаних підходів до аналізу мікроструктури і динаміки біологічних систем поки що не існує. Зокрема, не розроблені методи інтегральної оцінки динамічного стану системи; практично немає методів диференційного визначення окремих внутрішніх релаксаційних мод об'єкту. Тому будь-які нові ідеї в частині структурно-динамічного аналізу біосистем, або орієнтована адаптація вже добре відпрацьованих фізичних методів, безумовно, сприяє прогресу цієї, надзвичайно цікавої, області біофізики.

Напевне, не буде перебільшенням сказати, що серед потужного арсеналу фізичних методів, залучених для вирішення зазначеної проблеми, провідне місце займають спектроскопічні, серед яких слід відзначити оптичну спектроскопію. У встановленні деяких важливих закономірностей функціонування і навіть еволюції біологічних систем, що витікають із аналізу їх внутрішньої динаміки, надзвичайно плідними виявилися дослідження реакції об'єкту на вплив високочастотного електромагнітного поля міліметрового діапазону.

Мета дослідження:

визначити загальні закономірності формування фотон-кореляційних спектрів рідких біологічних систем різноманітного ієрархічного рівня та їх моделей; розробити експериментальні та комп'ютерні підходи для визначення структурно-динамічних параметрів об'єктів на основі даних фотон-кореляційної спектроскопії (ФКС).

Основні завдання роботи:

1. Дослідити фотон-кореляційні спектри квазіпружного розсіяння світла рідкими біологічними системами різноманітного ієрархічного рівня та їх моделями;
2. Визначити спектральні та кореляційні характеристики світла, розсіяного біологічними системами, що знаходяться під дією низькоенергетичного збурення;
3. Визначити параметри мікроструктури і динаміки біологічних об'єк-

тів різноманітного ієрархічного рівня та їх моделей методами фотон-кореляційної і традиційної оптичної спектроскопії;

4. Дослідити методами ФКС стохастичну динаміку мікроорганізмів – потенціальних мікробних сенсорів;

5. Розробити концепцію динамічного біосенсора, тобто біологічного об'єкту, який в певних умовах реєструє вплив зовнішнього фактору шляхом змінення свого динамічного стану, а не структури.

Наукова новизна.

Проведено систематичні дослідження структурно-динамічного стану рідких біологічних систем різного рівня складності: індивідуальних білків, моделей замкнених біологічних мембран – ліпосом, цільних живих клітин (мікроорганізмів).

– експериментально встановлено, що низькоенергетичний вплив на біологічні макромолекули, зокрема на білки, призводить до зміни характеру їх внутрішньої релаксаційної динаміки і дає змогу одержати нову індивідуальну характеристику макромолекули – характеристику її динамічного стану.

– експериментально досліджені методами ФКС температурні конформаційні переходи у фібріногені та його Д-фрагменті: оборотний – при $\sim 12^{\circ}\text{C}$ та необоротний – при $\sim 50^{\circ}\text{C}$.

– детально проаналізовано процес полімерізації фібріногену під дією рептилази; за допомогою ФКС вдалося дослідити початковий етап полімерізації – первинну збірку протофібрил, що неможливо спостерігати ніяким іншим методом.

– розроблено напівемпіричний метод визначення розміру та параметрів мікроструктури ліпосом шляхом вимірювання тільки двох традиційних спектроскопічних характеристик: оптичної густини та інкременту показника заломлення світла.

– визначені параметри мікроструктури ліпосомальних частинок, зокрема товщина ліпідного бішару мембрани, а також проведено оцінку розподілу частинок за розміром у суспензії ліпосом шляхом комбінації методу лазерної кореляційної спектроскопії із методами традиційної оптичної спектроскопії.

– досліджено агрегаційні процеси у суспензіях ліпосом, де показано, що метод ФКС дозволяє відрізнити процес злиття частинок з об'єднанням ліпідної субстанції без порушення неперервності бішару від простого злипання частинок з утворенням олігомерних агрегатів.

– досліджено методами ФКС динаміку мікроорганізмів, здатних до самостійного руху; показано, що мікрохвильове випромінювання змінює середню швидкість стохастичного руху клітин і одночасно викликає колективне переміщення популяції – *радіотаксис*.

– доведено існування явища радіотаксису шляхом окремого експерименту на спеціально виготовленому для цієї мети оптичному приладі, який дозволяє зареєструвати градієнт концентрації, виникаючий у вимірювальній кюветі внаслідок дії мікрохвильового електромагнітного поля.

Практична значимість.

Розроблений у дисертації метод аналізу температурного впливу на рухливість мікроорганізмів може бути застосований для чіткого визначення температури максимальної біологічної активності різноманітних бактеріальних штамів, в тому числі мікробіологічних продуцентів, що застосовуються у біотехнології для одержання висококоштовних лікувальних препаратів.

Технічне рішення щодо позбавлення низькочастотних ($0 \div 2$ кГц) коливань інтенсивності лазерного випромінювання може бути застосоване для стабілізації лазерних джерел по світловому потокові.

Виявлена надзвичайно чутлива кінестезична реакція мікроорганізмів до дії мікрохвильового електромагнітного випромінювання може бути покладена в основу розробки надчутливих мікробних сенсорів фізичних полів.

Розроблений у дисертації метод радіочастотного зондування динамічної структури білків може бути застосований у пошуку фермент-субстратних пар макромолекул із співпадаючими модами релаксаційної динаміки.

Створений інформаційно-вимірювальний комплекс широко застосовується для біофізичних досліджень в Інституті біохімії Національної Академії наук України та інших установах НАНУ.

Положення, що виносяться на захист.

Окрім конкретних результатів, викладених у розділах «Наукова новизна» і «Головні висновки», автор захищає такі узагальнені положення:

1. Спектральні і кореляційні характеристики світла, розсіяного рідкими біологічними системами, формуються як адитивна суперпозиція вкладів усіх, що протікають у системі, динамічних процесів із діапазо-

ном характерного часу кореляції від долей мікросекунд до десятків секунд.

2. Інформативність методу фотон-кореляційної спектроскопії збільшується у випадку аналізу рідких біологічних систем, що знаходяться під дією низькоенергетичного збурення.

3. Вплив мікрохвильового електромагнітного випромінювання на розчин біологічних макромолекул викликає перерозподіл макромолекул по конформаційним ступеням свободи; залежність коефіцієнта трансляційної дифузії, виміряного методом ФКС, від частоти діючого на розчин мікрохвильового поля може бути використана як об'єктивна характеристика релаксаційної динаміки біологічних макромолекул у рідкому середовищі.

4. Використання ФКС у комплексі із традиційною оптичною спектроскопією дозволяє одержати характеристики мікроструктури рідких біологічних систем, які раніш вважались недоступними для визначення оптичними методами.

5. Вплив електромагнітних хвиль міліметрового діапазону на популяції плаваючих мікроорганізмів є нетепловим і викликає істотні зміни колективного та стохастичного руху клітин – *явище радіотаксису*.

6. Динамічні процеси у молекулярних і клітинних біологічних системах можуть бути покладені за основу для створення сенсорів принципово нового типу – динамічних біосенсорів.

Апробація дисертації.

Матеріали дисертації обговорювались на наукових семінарах Інститутів Національної Академії наук України: біохімії ім.О.В.Палладіна, фізики, кібернетики ім.В.М.Глушкова. Доповіді по темі дисертації були заслухані: у Міжгалузевому науково-інженерному центрі з фізики живого і мікрохвильової резонансної терапії «Відгук» при Кабінеті Міністрів України, на фізичному факультеті Київського університету, в Інституті біоорганічної хімії ім.М.М.Шемякіна РАН (Москва), Інституті білка РАН (Пушино), Ленінградському Інституті ядерної фізики ім.Б.П.Костянтинова (Гатчина), Науково-дослідному і приладобудівному Інституті (Нижній Новгород).

Результати досліджень, викладені у дисертації, були представлені і опубліковані у працях наукових форумів міжнародного та вітчизняного рівня, в тому числі:

– 6-ой Республиканской конференции по физической химии (Киев, 1964);

- 1-ом Украинском биохимическом съезде (Черновцы, 1965);
- 2-ом Всесоюзном биохимическом съезде (Ташкент, 1969);
- 2-ом Республиканском совещании по физической химии (Киев, 1969);
- 2-ой Всесоюзной конференции по масс-спектрометрии (Ленинград, 1974);
- 3-ей Всесоюзной конференции по спектроскопии биополимеров (Харьков, 1977);
- Республиканском семинаре “Спектроскопия молекул и кристаллов” (Ужгород, 1980);
- 4-ой Всесоюзной конференции по спектроскопии биополимеров (Харьков, 1981);
- 4-ой Международной конференции по жидким кристаллам (Тбилиси, 1981);
- Всесоюзном совещании “Люминисцентный анализ в медицине и биологии” (Рига, 1987);
- 6-ой Всесоюзной конференции по спектроскопии биополимеров (Харьков, 1988);
- 20-ом Всесоюзном съезде по спектроскопии (Киев, 1989);
- I-ом Всесоюзном симпозиуме с международным участием “Фундаментальные и прикладные аспекты применения миллиметрового излучения в медицине” (Киев, 1989);
- 4-ой Всесоюзной школе “Автоматизация научных исследований в ядерной физике” (Ужгород, 1990);
- 3-ем Межреспубликанском семинаре “Научприбор-90” (Судак, 1990);
- 8-ом Международном симпозиуме по проблемам модульных информационно-вычислительных систем и сетей (Дубна, 1991);
- Всесоюзном семинаре “Проблемы изучения информационно-энергетических процессов в природе” (Киев, 1991);
- I-ом Украинском биофизическом съезде (Киев, 1994).

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Дисертація складається із вступу, шести глав, у яких викладено основні результати, висновків і списку цитованих робіт.

У вступі коротко описані можливості ФКС, її прогресуюча роль у біофізичних дослідженнях рідких систем, вказані головні труднощі, з якими доводиться зустрічатися у практичній роботі.

У першій главі систематизовані основні рідкі біологічні системи, з якими частіше усього доводиться мати справу в практиці біофізичних досліджень. Далі чітко визначені поняття мікроструктури і релаксаційної динаміки рідких біологічних систем; особливо підкреслюється та обставина, що, незважаючи на стохастичність релаксаційних рухів в молекулярних та клітинних біологічних об'єктах, можливі адекватні експериментальні і комп'ютерні підходи до кількісного опису такого роду динаміки. В цій главі обговорюється проблема функціональної ролі динамічних процесів і перспективи побудови кореляцій «структура + динаміка – функція», аналогічних добре перевіченим співвідношенням «будова-властивості», що мають місце для великої кількості простих об'єктів неживої природи.

Значна роль молекулярної динаміки у рідких біосистемах демонструється розглядом гідродинамічних сил Бьоркнеса, де показано, як внутрішньомолекулярні пульсації білкових молекул призводять до виникнення колективного макроефекту у розчині білка. На завершення глави сформульована загальна мета дослідження, конкретні експериментальні завдання і основні положення, що виносяться автором на захист.

У другій главі розглянуті деякі теоретичні питання ФКС, насамперед ті, які так чи інакше пов'язані із представленим у дисертації експериментальним матеріалом. Зокрема, в цій главі розглянуто подання електромагнітного поля, як випадкової величини, його математичний опис і статистичні характеристики, формалізовані у вигляді параметрів, що піддаються кількісному аналізу, – кореляційної функції та спектра потужності. Проаналізовані кореляційні властивості електромагнітного випромінювання, основою опису яких є функція когерентності, що повністю визначає статистичні властивості оптичного поля, напруженність якого описується згідно з розподілом Гауса. Показана роль хвильових інтерференційних процесів у формуванні флуктуацій сигналу фотодетектора і засоби аналізу інформативної частини цього сигналу. Зокрема, розглянуті методи гомодинної реєстрації і оптичного гетеродинування. Особливу увагу приділено впливу стохастичних перешкод, в першу чергу дробового шуму, на точність визначення кореляційних характеристик розсіяного світла і засоби зменшення апаратурних похибок у вимірювальних процедурах.

Приводяться найбільш розповсюджені оцінки основних, що підляга-

ють вибіру, фізичних параметрів оптичного модуля експериментальної установки — об'єму, що розсіює, телесного кута когерентності, площі когерентності тощо. В цій главі також розглянуто фізичний процес розсіяння світла на частинках у рідині і на основі елементарних теоретичних положень показано, як утворюється гетеродинний спектр розсіяного випромінювання $I^{(1)}(\omega)$, що містить дві найважливіші фізичні характеристики: дифузійне розширення Dq^2 і доплеровський зсув частоти qV :

$$I^{(1)}(\omega) = (A/\pi)(Dq^2/[(\omega - qV)^2 + (Dq^2)^2]), \quad (1)$$

де A — довільна стала, D — коефіцієнт трансляційної дифузії, ω — циклічна частота світла, V — швидкість колективного дрейфу частинок під впливом зовнішніх сил, q — хвильовий вектор розсіяння;

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin \frac{\theta}{2}, \quad (2)$$

де n — показник заломлення світла рідиною, λ — довжина світлової хвилі у вакуумі, θ — кут, під яким спостерігається розсіяне світло.

Фур'є-перетворення виразу (1) дає кореляційну функцію розсіяного оптичного поля:

$$G^{(1)}(\tau) = A \exp(-Dq^2|\tau| - iqV\tau). \quad (3)$$

У другій главі обговорюється також поняття форм-фактору, причини, що призводять до його модуляції і його зв'язок із оптичними властивостями розсіюючого середовища. Даються параметричні критерії вкладу внутрішнього руху в частинках у процес динамічного розсіяння світла. Нарешті, в цій главі зроблено короткий огляд основоположних експериментальних робіт в області ФКС, починаючи із її зародження і до останнього часу, і проаналізовані найбільш важливі, на думку автора, прикладні дослідження біологічних об'єктів. На закінчення другої глави розглянуті методи математичної обробки даних ФКС, які у різних модифікаціях використовувались автором у практичній роботі. На цих методах доцільно зупинитись більш докладно, оскільки при завершеній конструкції експериментального обладнання підвищення інформативності ФКС можливе лише за рахунок більш досконалої математичної обробки результатів вимірювань. Тривіальна процедура підбору теоретичної кривої, найбільш близької до експериментальної, є

коректною лише у тому випадку, коли розсіююча світло фаза утворена сферичними частинками однакового розміру. В цьому, що майже не трапляється на практиці, випадку спектр потужності являє собою лоренціан, а кореляційна функція — експоненту. Подавляюча ж більшість реальних біологічних систем далека від такої простої моделі. Отже для адекватного аналізу результатів доводиться розробляти досить складні алгоритми. Перший крок до аналізу систем, складніших, ніж монодисперсні, полягав у моделюванні вимірної кривої сумою двох (іноді — трьох) аналітичних функцій: експонент, якщо вимірювалась кореляційна функція, і лоренціанів, якщо вимірювався спектр потужності. А потім міцні позиції завоював метод кумулянтів (запропонований Коппелем у 1972 році), що не втратив до теперешнього часу свого значення у справі аналізу даних ФКС. Метод базується на вочевидь логічній посліпці, яка полягає в тому, що будь-яка, одержана у ФКС-експерименті, кореляційна (спектральна) крива являє собою деякий розподіл експонент (лоренціанів). Числові статистичні характеристики цього розподілу — центральні моменти — визначаються через кумулянти, що є коефіцієнтами K_n ряду (розклад кореляційної функції):

$$G(\tau) = G(0)\exp\left(-\sum_{n=1}^{\infty} K_n |\tau|^n \frac{1}{n!}\right). \quad (4)$$

Перші три кумулянти будь-якого розподілу дорівнюють відповідно першим трьом центральним моментам: медіані (математичне очікування), дисперсії та числовій характеристиці асиметрії розподілу («перекосові»). Легко бачити, що у випадку монодисперсної системи, усі кумулянти, крім першого, дорівнюють нулю. Для складних систем перші кумулянти отримують певний фізичний зміст. Так, K_1 характеризує середній по розподілу розмір частинок, K_2 — полідисперсність, K_3 — співвідношення швидких і повільних релаксаційних процесів у досліджуваній системі. Звичайно, похибка відновлення кожного наступного кумулянту у декілька разів більша, ніж попереднього; і при існуючій точності вимірів вже четвертий кумулянт, що характеризує ексцес («гостровершинність») розподілу, — фактично недостовірний. Але у різноманітних порівняльних дослідженнях і, особливо, при опису змін, що протікають в одному й тому ж зразку, метод кумулянтів «працює» чудово. Нарешті «останнє слово» в математичній обробці первинної інформації ФКС належить так званим регулярним методам,

які виявились найбільш ефективними в одержанні адекватної інформації про фізичні параметри аналізуємої системи.

Як відомо, повне розв'язання оберненої спектральної задачі ФКС зводиться до розв'язання інтегрального рівняння виду:

$$\text{const} + \int_0^{\infty} K(\Gamma, y)A(\Gamma)d\Gamma = F(y), \quad (5)$$

де $F(y)$ – вимірювана кореляційна функція або спектр потужності оптичного поля, розсіяного вивчаємим об'єктом; $K(\Gamma, y) = \exp(-\Gamma \cdot y)$ – в разі вимірювання кореляційної функції, і $K(\Gamma, y) = \Gamma/(\Gamma^2 + y^2)$ – в разі вимірювання спектру потужності, Γ – обернений час релаксації, $A(\Gamma)$ – функція розподілу інтенсивності розсіяння світла частинками по характерним для них дифузійним розширенням, const – невідома константа. Вираз (5) являє собою рівняння Фредгольму 1-ого роду і, як відомо, його розв'язок, що полягає у відшуванні $A(\Gamma)$, нестійкий по відношенню до малих варіацій $F(y)$. На щастя, це притаманно тільки загальному, універсальному розв'язкові в класі довільних інтегруємих функцій. Якщо ж за допомогою додаткових умов вдається звужити клас відшукуваних функцій, розв'язок може виявитись стійким. По суті, засоби звуження класу відшукуваних функцій до ступеня, що забезпечує стійкість розв'язку, і складають зміст регулярних методів. У більшості випадків достатніми виявляються усього три вимоги, що накладаються на відшукуваний розподіл $A(\Gamma)$: невід'ємність, граничність і гладкість. Перші дві вимоги виконуються автоматично, якщо йдеться про аналіз даних ФКС; у супротивному випадку розв'язок не має фізичного змісту. Вимога згладжування разом із граничністю дозволяє виділити компактну за критерієм Риссу множину функцій, куди обов'язково потрапляє відшукуваний розв'язок. Тоді задача обернення рівняння Фредгольму 1-ого роду стає коректною за Тихоновим і зводиться до стандартної процедури мінімізації функціоналу:

$$\Phi(A) = \int_a^b [F(y) - \int_a^b K(\Gamma, y)A(\Gamma)d\Gamma]^2 dy. \quad (6)$$

На жаль, поняття «сгладженість» неможливо інтерпретувати у елементарних математичних термінах. Так, наприклад, значне розповсюдження одержало подання «гладкого» розв'язку у вигляді гістограми із

шириною стовпчика σ або у вигляді набору δ -функцій, проміжок між якими дорівнює σ . В обох випадках σ як раз і являє собою параметр сглаженості. При використанні стабілізуючого функціоналу в регуляризації за Тихоновим, у ролі параметра сглажування виступає числовий коефіцієнт при цьому функціоналі.

Третя глава дисертації – «Експериментальна частина» – присвячена вирішенню питань техніки вимірювань і комп'ютерної обробки. В цій главі описується створений автором інформаційно-вимірювальний комплекс для одержання спектрів потужності і кореляційних функцій інтенсивності квазіпружно розсіяного світла, їх попередньої та остаточної математичної обробки. Подається структурна схема реєстрації розсіяного світла, склад і схема взаємодії радіовимірювальних модулів аналізуючої електроніки, технічний опис використаних засобів обчислювальної техніки. Тут же приведені характеристики когерентних джерел світла – лазерів, які застосовувались у проведених дослідженнях; розглянуті різноманітні засоби оптимізації оптичних вимірів і їх конкретна реалізація у створеній вимірювальній установці. Далі описується розроблений пристрій магнітно-оптичного демодулятора, усуваючого низькочастотний паразитний шум у первинному лазерному промені. В цій ж главі описано структуру фізичних зв'язків між оптичними, електронними і обчислювальними елементами інформаційно-вимірювального комплексу; подано структуру системного програмного забезпечення і охарактеризовані можливості комп'ютерних програм користувача.

У главі докладно проаналізовані засоби підвищення співвідношення «сигнал-шум» і подано алгоритм організації неперервних автоматизованих вимірювань. Справа в тому, що ряд біофізичних задач ФКС вимагає неперервного вимірювання автокореляційної функції (АКФ) інтенсивності розсіяного світла і запису інформації у вигляді послідовності десятків, а іноді і сотен файлів, без участі оператора. Цей режим організовано таким чином: після накопичення корелометром запрограмованої кількості реалізацій АКФ (перший файл), одержаний масив даних через канал загального користування (КЗК) автоматично скидається в магнітний накопичувач (МН ІЗОТ-5400) інформаційно-вимірювального комплексу, де спеціальна програма високого пріоритету формує файл даних, одночасно переводячи корелометр у стартовий режим для наступного вимірювання АКФ і видаючи команду на поча-

ток вимірювання. Таким чином, накопичування заданої кількості файлів даних провадиться у повністю автоматизованому режимі. Оператор лише вказує дискрет вимірювання АКФ (мінімальний час затримки), кут спостереження розсіяного світла, необхідну кількість файлів та ідентифікатор імені записуваних файлів (буква). Ці дані автоматично заносяться у кожний файл і при обробці по черзі зчитуються програмою користувача, яка з єдиного запуску обробляє увесь масив накопичених файлів. Крім того, в ім'я кожного файлу за допомогою таймера заноситься поточний час вимірювання, що потім дозволяє будувати бездоганні часові залежності. Їстотно, що програма управління корелометром і програма остаточної обробки одержаних АКФ можуть працювати одночасно.

Якщо частинки, що розсіюють світло, не тотожні, але мають неперервний розподіл за розмірами, спектр розсіяного світла має вигляд:

$$I(\omega) = \frac{1}{\pi} \int_0^{\infty} \frac{A(\Gamma)\Gamma d\Gamma}{\omega^2 + \Gamma^2} + B, \quad (7)$$

доступний кумулянтному розкладанню:

$$I(\omega) = \frac{A\Gamma_0}{\pi(\omega^2 + \Gamma_0^2)} \left[1 + \frac{\Gamma_0^2 - 3\omega^2}{(\omega^2 + \Gamma_0^2)^2} Z \right] + B, \quad (8)$$

де A – інтеграл спектру (площина під кривою спектрального розподілу, що залишається після від'єму фону B), Γ_0 – медіана (середня по розподілу напівширина спектра, Z – дисперсія розподілу. Чотири параметри Γ_0 , Z , A та B , що входять до виразу (8), визначаються шляхом мінімізації функціоналу:

$$F(\Gamma_0, Z, A, B) = [I(\omega)_{\text{ек.}} - I(\omega)]^2, \quad (9)$$

де $I(\omega)_{\text{ек.}}$ – експериментальний спектр. Це як раз і є практичною реалізацією методу кумулянтів, оскільки Γ_0 і Z доводяться відповідно першим і другим кумулянтами розкладання функції $I(\omega)$. У ролі характеристики, що визначає ступінь полідисперсності зразку використовується безрозмірна величина (індекс полідисперсності):

$$Q = 1/2(Z/\Gamma_0^2). \quad (10)$$

Досвід практичної роботи доводить, що значення $Q \leq 0.1$ вказують на досить високу монодисперсність системи, що розсіює світло.

Для об'єктивної оцінки відповідності експериментального і підібраного розподілів було використано нормовану величину χ^2 :

$$\chi^2 = \sum_N \frac{[I(\omega)_{\text{екс.}} - I(\omega)]^2}{I(\omega)}, \quad (11)$$

де N – кількість використаних каналів аналізатора спектра (200).

Аналіз синтезованих комп'ютером спектральних розподілів із різним рівнем стохастичного шуму показав, що навіть при величині похибки амплітуди у кожному спектральному каналі у 3%, похибка визначення Γ_0 складає $\sim 7\%$. Зважаючи на те, що у реальних вимірюваннях похибка спектральної амплітуди у кожному каналі не перевищує 1.5%, точність практичних вимірювань можна вважати задовільною.

На заключення глави подані результати визначень головних параметрів спектральних розподілів від реальних об'єктів: монодисперсного полістирольного латексу, сировоткового альбуміну людини, віруса табачкової мозаїки, суспензії фосфатидилхолінових ліпосом, загиблих клітин культури *Dunaliella viridis*, полімерної форми фібриногену. Зокрема, три виміри, проведені із полістирольним латексом, дали такі результати: $\Gamma_0 = 720.2$; 716.6 та 716.9 Герц (відповідні гідродинамічні розміри: 109.9; 110.3 та 110.4 нм, при електронномікроскопічному розмірі – 110.0 нм); відповідно $Q = 0.078$; 0.086 та 0.092.

У четвертій главі наведені результати досліджень білкових розчинів. Зокрема, в інтервалі температур $6 \div 60$ °С досліджено температурну залежність коефіцієнту трансляційної дифузії фібриногену людини та його Д-фрагменту, що утворюється при обмеженому протеолізі фібриногену трипсином. Із одержаної залежності у фібриногена та його структурного Д-фрагмента знайдено два конформаційних переходи: оборотний – в інтервалі $12 \div 16$ °С та необоротний – $47 \div 53$ °С. Треба зауважити, що ці переходи раніш були виявлені методом флуоресцентної спектроскопії. Але ФКС дозволила одержати нову, досить цікаву, інформацію: так, низькотемпературний перехід при $12 \div 16$ °С пов'язаний із компактизацією Д-фрагменту, яка, як не дивно, викликає розгалуження структури цільного білка. Другий перехід ($47 \div 53$ °С) – суто денатураційний: розгалужується структура як Д-фрагменту, так і самого фібриногену, на що вказує різке зменшення коефіцієнту транс-

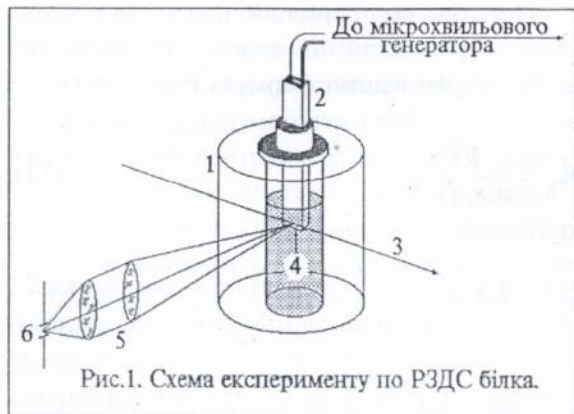
ляційної дифузії в обох зразках.

При дослідженні методом ФКС біологічної полімеризації фібрину під дією рептилази, у зразку достовірно реєструється зміна напівширини та індексу полідисперсності у перші ж 3-5 хвилин. Це відображує початковий молекулярний процес полімеризації, найбільш цікавий з біологічної точки зору, – первинну збірку протофібрил. При звичайних вимірюваннях оптичної густини не вдається не тільки проаналізувати, але навіть зафіксувати цей початковий процес. Подальший аналіз методом ФКС вказує, що по мірі відходу від молекулярного рівня (збірка протофібрил у фібрили), процес утворення фібринового згустку набуває все більш стохастичного характеру (неперервне зростання параметру Q).

Оскільки у дисертації було виконано експерименти по дослідженню внутрішньої динаміки білкових молекул, частина четвертої глави являє невеликий критичний огляд такого роду досліджень. Зокрема, відмічається, що головним недоліком вивчення внутрішньомолекулярної динаміки за допомогою різноманітних міток (флуоресцентні, спинові, ЯМР-, γ -резонансні) є та обставина, що ці методи суто локальні: вони відображують лише динаміку сенсорної групи атомів, або її найближчого оточення. Широкі можливості для конформаційного аналізу відкривають найсучасніші рентгено-структурні методи (наприклад, розсіяння синхротронного випромінювання, що дає змогу вимірювати температурні фактори і дифузне розсіяння), але завжди залишається проблема тотожності структурних змін білка в кристалі і у розчині. Тому поява будь-яких нових підходів до аналізу внутрішньомолекулярної динаміки являє, безумовно, крок уперед. Саме тому подальший матеріал глави присвячений впливу міліметрових електромагнітних хвиль на білкові розчини. Низькоенергетичне електромагнітне випромінювання вносить в процес рівноважної конформаційної динаміки дуже невелике за енергією збурення. Але, як виявилось, відгук системи досить істотно відрізняється в залежності від характеру збурення (частоти мікрохвильового електромагнітного поля).

Запропонований автором метод – радіочастотне зондування динамічної структури (РЗДС) білка – полягає у вимірюванні коефіцієнту трансляційної дифузії в залежності від частоти діючого на білковий розчин мікрохвильового поля. На рис.1 подано схему досліду. У кварцеву оптичну кювету (1), що містить розчин білка, занурений хвильо-

провід (2) із діелектричною заглушкою (4) на кінці, через яку у розчин потрапляє мікрохвильове випромінювання. Останнє підводиться до металічного конструктиву хвильоводу гнучким діелектриком від генератора Г4-141 або Г4-142. Сфокусований лазерний промінь (3)



проходить на відстані $0.01 \div 0.05$ мм від торця хвильоводу. Фотозбираючий пристрій (5) передає розсіяне світло на вхідну діафрагму (6) кореляційного спектрометра. Надалі звичайними засобами ФКС реструється спектр потужності або кореляційна функція інтенсивності

квазіпружно розсіяного білковим розчином світла. Втрати густини потужності мікрохвильового випромінювання на шляху від генератора до безпосередньо білкового розчину складають приблизно 75%. Отже на розчин діє дуже слабке мікрохвильове поле (~ 1 мВт/см²).

Із застосуванням описаної схеми були ретельно досліджені білкові розчини БСА, холінестерази, форміатдегідрогенази (форміат-ДГГ), алкоголь-ДГГ, лактат-ДГГ. Виявилось, що дія мікрохвильового поля на розчин білка при певних частотах із діапазону $54 \div 75$ Гц призводить до зміни гідродинамічного розміру молекули (радіусу - R). Причому, в залежності від частоти ν діючого поля, відношення R_ν/R може приймати відтворювані значення як більше, так і менше одиниці. У контрольних дослідах по динамічному розсіянню світла суспензією монодисперсного полістирольного латексу, із радіусом сферичних частинок 280 Å, у всьому згаданому діапазоні, навіть при збільшенні вихідної потужності генератора Г4-142 до максимальної, відношення R_ν/R практично не відхилялось від одиниці (максимальні випадкові відхилення ± 0.01). У той же час, наприклад, у лактат-ДГГ при $\nu=56.01$ Гц $R_\nu/R=1.10$, а при $\nu=65.74$ Гц $R_\nu/R=0.92$. Таким чином, в'язкопружні властивості розчинника (а він був однаковим і для латексу, і для білка) при мікрохвильовому опромінюванні не змінюються. Отже, має місце безпосередній вплив мікрохвиль на білкову молекулу.

Механізм зміни гідродинамічного розміру білків в мікрохвильовому полі, на думку автора, полягає в активізації випромінюванням певної релаксаційної моди, внаслідок чого змінюється розподіл молекул по конформаційним ступеням свободи. Тому при певній частоті діючого поля змінюється найбільш вірогідна конформація і це, природно, призводить до зміни коефіцієнту трансляційної дифузії молекули D_T (D_T і гідродинамічний розмір R_h зв'язує відома формула Ейнштейна:

$$R_h = \frac{kT}{6\pi\eta D_T}, \quad (12)$$

де T – абсолютна температура, η – в'язкість розчинника при температурі T). Порівняння даних РЗДС-експериментів показало, що принаймні у п'яти досліджених білків залежність коефіцієнту трансляційної дифузії від частоти діючого мікрохвильового поля суто індивідуальна. Але якщо у випадку БСА і холінестерази цей факт викликає певне задоволення, то у випадку дегідрогеназ – певне розчарування, оскільки використані у досліді дегідрогенази побудовані за одним принципом і є гомологами за ознаками третинної структури. Тому очікувалось, що форміат-ДГГ, алкоголь-ДГГ і лактат-ДГГ будуть подібні також і за характером конформаційної динаміки. Та треба прийняти до уваги, що метод РЗДС було застосовано у порівняно невеликому частотному діапазоні і тому робити занадто загальні висновки, мабуть, не варто. До того ж, з іншої точки зору, відсутність кореляції «третинна структура – внутрішня динаміка» може означати, що шляхи еволюції білкової структури і білкової динаміки не обов'язково співпадають.

З фізичної точки зору специфічний відгук білкової структури на мікрохвильовий вплив можна пояснити, як перехід молекули у стан із нерівноважною конформаційною динамікою, внаслідок дії зовнішнього регулярного фактору на окремі структурні елементи. Цей стан зберігається тільки на час дії згаданого фактору. І, дійсно, звертаючись до фізичної теорії внутрішніх рухів біологічних макромолекул, ми бачимо, що флуктуації простіших елементів білкової структури – бокових груп і зв'язаних молекул води мають амплітуди $\sim 0.3 \div 1 \text{ \AA}$, а характерні часи кореляції цих рухів лежать у наносекундному діапазоні (принаймні, при розгляді у рамках моделі броуновського осцилятора). Повертаючись до дії мікрохвильового поля, згадаємо, що його частоти

як раз відповідають оберненим наносекундам. Отже вплив періодичного електромагнітного поля на заряджені бокові групи білкової молекули може порушити рівноважність величезної кількості шляхів релаксації по конформаційним ступеням свободи. Як наслідок, виникає віртуальна гіперповерхня потенціальної енергії, існуюча поки діє поле. Відповідний цій поверхні новий набір конформаційних станів ФКС прочитує, як зміну (в середньому) коефіцієнту трансляційної дифузії.

В п'ятій главі методами ФКС і традиційної оптичної спектроскопії вивчалась мікроструктура ліпосом – замкнених квазісферичних моделей біологічних мембран. В главі описані також дослідження агрегаційної динаміки, що протікає у суспензіях цих частинок і моделює процеси, які мають місце в реальних біологічних об'єктах.

Для точного розрахунку геометричних параметрів ліпосом, виходячи із даних ФКС, потрібно попередньо визначити загальний вміст ліпиду у суспензії. Для проведення таких аналізів були залучені методи традиційної оптичної спектроскопії: дослідження інфрачервоного поглинання і рефрактометрія. Спектри інфрачервоного поглинання вимірювались на ІЧ-спектрофотометрі «*Specord-75*», рефрактометричні вимірювання виконувались на рефрактометрі ІРФ-23 та інтерферометрі ІТР-2 на стандартній для ІТР-2 довжині хвилі 550 нм. В оптичну систему приладу ІРФ-23 монохроматичне світло підводили від монохроматора МРФ-4 фірми «*Hitachi*» за допомогою гнучкого світлопроводу.

Для одержання монодисперсних фракцій ліпосом різноманітного розміру, початково виготовлений препарат пропускали через колонку (29 см) із сефарозою 4В. Оптичну густину суспензії, що виходить із колонки, записували неперервно при $\lambda=550$ нм на спектрофотометрі «*Beckman*» за допомогою протокової кювети.

Визначення загального вмісту ліпиду методом ІЧ-спектроскопії, безпосередньо у водній суспензії ліпосом неможливе. Тому ліпід троекратно екстрагували хлороформом, а потім переводили у розчин CCl_4 . За аналітичні були вибрані інфрачервоні смуги поглинання з максимумами при 2850 см^{-1} і 2920 см^{-1} , відповідні симетричним і асиметричним валентним коливанням С–Н-зв'язків у метильних та метиленових групах. Калібровочні залежності будувались по трьом показникам: інтенсивностям в максимумах смуг 2850 см^{-1} і 2920 см^{-1} та інтегральній інтенсивності ІЧ-поглинання в області $2600\text{--}3200 \text{ см}^{-1}$. До незручностей методу треба поставити необхідність екстракції органіч-

ної речовини із водної суспензії і потребу розбавлення розчинів з великим вмістом ліпиду до концентрацій, не перевищуючих 4 мг/мл (як показує досвід, при вищих концентраціях зростає похибка визначення методом ІЧ-спектроскопії). Від цих недоліків вільний метод рефрактометрії (вимірювання різниці показників заломлення суспензії і розчинника), але він непридатний для аналізу зразків, що містять ліпосоми порівняно великого розміру ($R \geq 1000 \text{ \AA}$), через значне розсіяння світла. Оскільки товщина ліпідного бішару складає приблизно 40 \AA , ліпосоми із радіусом, меншим ніж 100 \AA , не утворюються. Таким чином, в діапазоні радіусів $100 \div 1000 \text{ \AA}$ ми маємо змогу порівняти

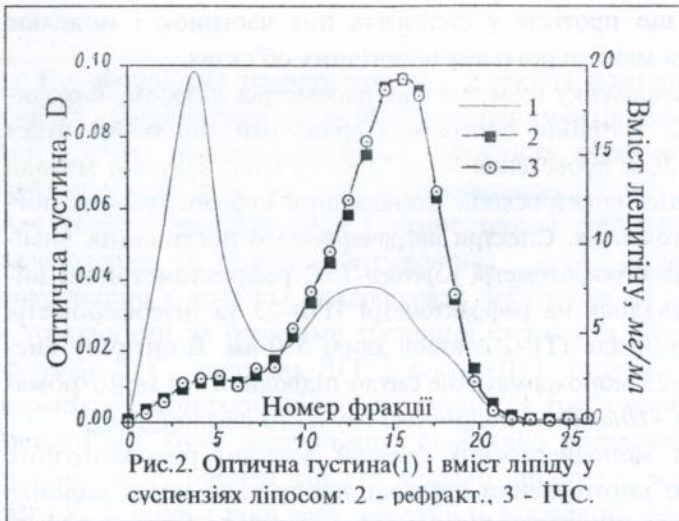


Рис.2. Оптична густина(1) і вміст ліпиду у суспензіях ліпосом: 2 - рефракт., 3 - ІЧС.

методи ІЧ-спектроскопії і рефрактометрії. На рис.2 показано зміну оптичної густини і вмісту ліпиду по мірі виходу суспензії з розділюючої колонки із сефарозою. Отже рисунок 2 переконливо свідчить, що аналіз

на вміст ліпиду методом рефрактометрії і ІЧС дає практично співпадаючі результати. Як відомо, товщина μ ліпідного бішару ліпосомальних частинок визначається тільки природою ліпиду (довжиною гідрофобного вуглеводневого ланцюга) і, звичайно, не залежить від розміру частинки. Виходячи з цього очевидного положення і теорії розсіяння світла частинками малого розміру вдалося побудувати теоретичну залежність відношення $D/\Delta n_0$ від розміру ліпосом (Δn_0 – інкремент показника заломлення суспензії):

$$\frac{D}{\Delta n_0} = f(\Delta n, \mu, \lambda) \int_0^{\frac{4\pi R}{\lambda}} \frac{\sin^2 \chi}{\chi} d\chi, \quad (13)$$

де $f(\Delta n, \mu, \lambda)$ – деяка комбінація параметрів, що не залежить від розмі-

ру ліпосом і є константою для даного ліпиду (тут Δn – різниця показників заломлення ліпиду і розчинника).

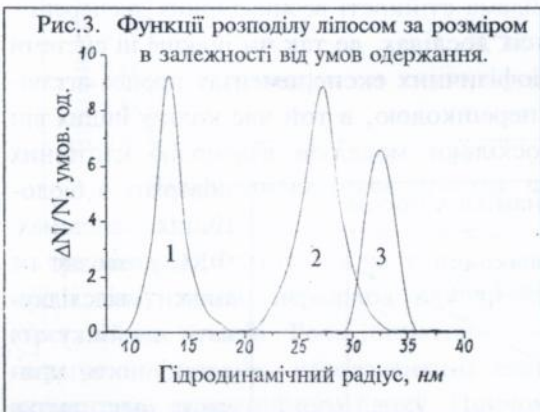
Інтеграл $\int_0^{\lambda} \frac{4\pi R}{\chi} \sin^2 \chi d\chi$ визначається тільки розміром частинок і довжиною світлової хвилі.

Експериментальна перевірка підтвердила правильність теоретичних уявлень.

Так було одержано простий метод швидкої оцінки розміру частинок у ліпосомальних суспензіях по значенням тільки двох традиційних оптичних показників: D і Δn_0 . Метод на протязі багатьох років застосовується для визначення розмірів ліпосом, що утворюються під дією ультразвуку на водноліпідну суміш. Саме «ультразвукові» ліпосоми виявились найбільш зручним дослідницьким матеріалом, оскільки вони мають не дуже великі розміри (спрацьовує рефрактометричне визначення ліпиду) і мають досить вузькі розподіли частинок за розміром.

На рисунку 3 подані розподіли за розміром ліпосом, одержаних на диспергаторі УЗДН-2Т при частотах ультразвуку 22 кГц (1 – стержневий випромінювач, 2 – трубковий концентратор) і 44 кГц (3 – стержневий випромінювач).

Для визначення середнього розміру частинок був застосований метод кумулянтів; відновлення функцій роз-



поділу частинок за розміром виконано методом регуляризації оберненої спектральної задачі (застосовано алгоритм С.П.Толпіної). Вимірювання ФК-спектрів провадились у гетеродинному режимі.

Нарешті, спільне використання ФКС разом із вищезгаданими методами традиційної оптичної спектроскопії дозволяє визначити всі невідомі параметри мікроструктури фракцій суспензії ліпосом, що послідовно виходять з хроматографічної колонки (Таблиця 1).

N – концентрація, S , V – відповідні значення загальної питомої поверхні і внутрішнього об'єму частинок, q – розподіл швидкостей зату-

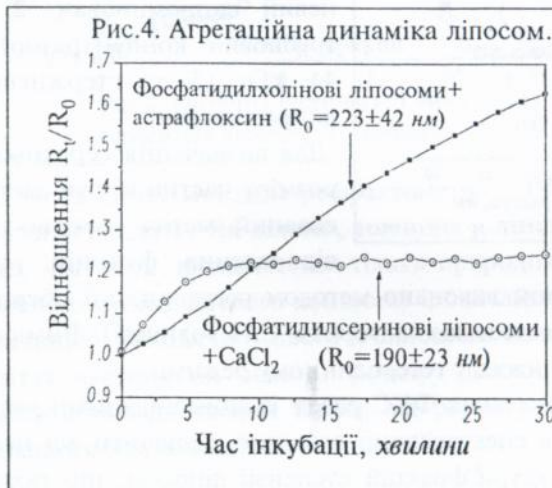
хання суперпозиції кореляційних функцій (аналог індексу полідисперсності Q ; в цьому досліді величини R і q виміряні на кореляційному фотометрі «Малверн-4300»).

Таблиця 1

Мікроструктура фракцій суспензії фосфатидилхолінових ліпосом, виходячих з хроматографічної колонки із сефарозою 4В.

№	$R, \text{Å}$	$\mu, \text{Å}$	$N, 10^{13} \text{ см}^{-3}$	q	$S, \text{ м}^2$	$V, \text{ см}^3$
1.	650 ± 30	40 ± 3	0.98	0.224	0.058	0.018
2.	438 ± 24	38 ± 5	4.76	0.376	0.087	0.012
3.	345 ± 45	43 ± 4	5.72	0.238	0.165	0.009
4.	220 ± 18	39 ± 3	4.02	0.320	0.239	0.011
5.	136 ± 10	40 ± 2	5.06	0.329	0.437	0.008

Останній розділ п'ятої глави присвячено агрегаційній динаміці у везикулярних суспензіях. Проблема стійкості везикулярних дисперсних систем виникає практично в усіх дослідях, де так чи інакше ці системи використовуються. В одних біофізичних експериментах процес аглютинації везикул є небажаною перешкодою, в той час коли у інших він являє самостійний інтерес, оскільки моделює взаємодію клітинних

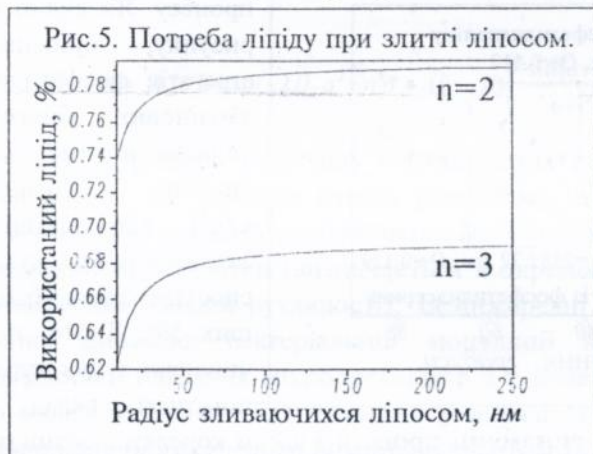


поверхнь в біологічних системах. ФКС дозволяє не тільки відслідкувати динаміку агрегаційного процесу, але також з'ясувати механізм протікаючої аглютинації. На прикладі двох модельних систем показано, як за допомогою ФКС

вдається відрізнити агрегацію з утворенням нової цільної частинки (злиття) від простого злипання частинок. Для досліду були використані фосфатидилхолінові та фосфатидилсерінові ліпосоми. У першому

випадку агрегаційний процес ініціювали астрафлосином, у другому – CaCl_2 . На рис.4 показано зміну співвідношення гідродинамічних радіусів R_t/R_0 в залежності від часу інкубації t .

Із рис.4 випливає, що агрегаційний процес в суспензії фосфатидилсеринових везикул полягає у злитті двох частинок з утворенням спільного бішару. На цьому процес зупиняється, оскільки навіть при двохчастковому злитті на утворення моноламельярного шару нової частинки треба менш ніж 80% ліпиду, що міститься у двох зливаючихся частинках (див. рис.5). А при трьохчастковому злитті «зайвого» ліпиду



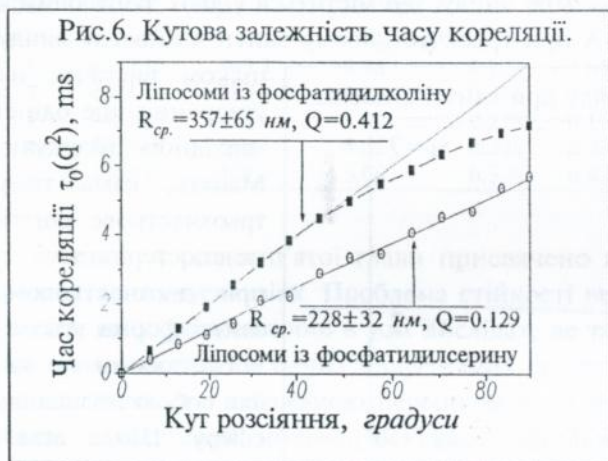
цілком вистачає на утворення ще однієї «вихідної» везикули. Мабуть, саме тому трьохчасткове злиття не спостерігається, а при двохчастковому злитті форма утвореної ліпосоми не являє собою правильну сферу. Щодо аглютинації ліпосом із фосфатидилхоліну,

то тут має місце злипання частинок, без об'єднання ліпідної субстанції, і тому немає перешкод для неперервного зростання розмірів агрегаційних блоків. Роль ініціатора аглютинації – астрафлосина – полягає в утворенні нековалентних електростатичних зв'язків поміж елементами агрегаційного блоку. Причому адгезійний контакт скоріш за все є ковзним. В усякому разі, астрафлосин, повністю зв'язуючись з ліпосомами, майже не втрачає орієнтаційної рухливості. Так, по даним спектральних і поляризаційних флуоресцентних вимірювань, для чистого розчину астрафлосину $\lambda_{збудж.} = 491 \text{ нм}$, $\lambda_{фл.} = 560 \text{ нм}$, ступінь поляризації $P = 0.367$, а у суспензії ліпосом із фосфатидилхоліну – $\lambda_{збудж.} = 481 \text{ нм}$, $\lambda_{фл.} = 571 \text{ нм}$, $P = 0.380$. Але тоді і складовим агрегаційного блоку – вихідним частинкам – повинна бути притаманна значна рухливість у самому блоці. Цією рухливістю модулюється форм-фактор агрегаційного утворення. Окрім того, при значній асиметрії агрегатів, істотним виявляється внесок орієнтаційної динаміки,

який методом ФКС прочитується, як додаткова модуляція форм-фактору. Обидва ці процеси дають в динамічне розсіяння світла вклад одного знаку і, на жаль, не можуть бути розрізнені за допомогою ФКС. Та коли такий вклад виявлено, то це безумовне свідомо складової структури присутніх у суспензії агрегаційних комплексів.

На рис.6 показано кутову залежність часу кореляції трансляційної моди для двох суспензій ліпосом після їх 30-хвилинної інкубації із

відповідними ініціаторами агрегаційного процесу. Як видно із рисунку, суспензія агрегатів фосфатидилхолінових ліпосом виявляє істотне відхилення функції $\tau_0(q^2)$ від лінійної залежності при кутах спостереження, більших 50° . Тобто, починаючи з цих кутів, помітний вклад в



розсіяння світла вносять динамічні процеси з часом кореляції, меншим, ніж час кореляції трансляційних брукань.

Таким чином, кутові вимірювання дають змогу з'ясувати природу агрегатів навіть тоді, коли з якихось причин не вдалося спостерігати динаміку агрегаційного процесу.

У останній, шостій главі наведені і обговорюються дані ФКС рухливих популяцій клітин еукаріот і прокаріот (бактерій). ФКС докорінно змінила ситуацію в дослідженнях клітинного руху, привнесши в них відносну простоту, прецезійну точність і статистичну достовірність. Адаптація ФКС до аналізу клітинної рухливості вимагає, звісно, нових алгоритмів обробки даних, оскільки, на відміну від термодинамічно рівноважних умов, активний рух клітин призводить до дуже різноманітних форм вимірюваних кореляційних функцій (наприклад, якщо швидкості власних лінійних переміщень бактерій підпорядковуються гамма-розподілу, відповідна кореляційна функція є лоренціан).

Але труднощів принципового характеру не виникає. Єдиний вірогід-

ний артефакт, наявність якого легко перевіряється, це можлива фототактильна реакція клітин на зондуєче лазерне випромінювання. Втім, фототропні бактеріальні штами добре відомі, так що про можливі експериментальні ускладнення відомо апріорі.

Автокореляційна функція інтенсивності розсіяного світла (АКФ ІРС) містить інформацію не тільки про середню швидкість власних рухів бактерій, але і про функцію розподілу швидкостей бактеріального руху. Вираз для ненормованої кореляційної функції інтенсивності світла, розсіяного суспензією плаваючих мікроорганізмів, має вигляд:

$$G^{(2)}(\tau) = A + B \exp(-2D_T q^2 \tau) [\beta + (1 - \beta) \int_0^\infty \frac{\sin(q\tau V)}{q\tau V} P(V) dV]^2, \quad (14)$$

де $P(V)$ – функція розподілу стохастичних швидкостей клітин, β – доля клітин, які втратили власну рухливість, A і B – коефіцієнти, що визначаються умовами вимірювань, D_T – коефіцієнт пасивної трансляційної дифузії клітин (визначається в окремому досліді на бактеріях, позбавлених власної рухливості). Безпосередні кінографічні спостереження динаміки бактеріальної популяції вказують, що розподіл швидкостей плавання мікроорганізмів в рівноважних умовах близький до максвеловського. Тоді інтеграл у виразі (14) обчислюється аналітично і для безпосередньо вимірюваної АКФ ІРС маємо:

(15)

$$G^{(2)}(\tau) = F(A, B, V_0, \beta) = A + B \exp(-2D_T q^2 \tau) [\beta + (1 - \beta) \exp(-\frac{1}{4} q^2 \tau^2 V_0^2)]^2.$$

Мінімізація функціоналу $F(A, B, V_0, \beta)$ методом нелінійної регресії дозволяє знайти всі чотири параметри (A являє собою фон кореляційної кривої). Із виразу для $G^{(2)}(\tau)$ можна виділити частину $S(\tau)$, що вміщує параметр V_0 , який залежить від числа рухливих бактерій в об'ємі суспензії, що аналізується:

(16)

$$S(\tau) = B(1 - \beta) \exp(-2D_T q^2 \tau) [2\beta \exp(-\frac{1}{4} q^2 \tau^2 V_0^2) + (1 - \beta) \exp(-\frac{1}{2} q^2 \tau^2 V_0^2)]$$

Просумовуючи $S(\tau)$ по всім каналам корелометра, одержуємо величину, пропорційну концентрації рухливих бактерій в частині суспензії, звідкілья здійснюється фотозбір розсіяного світла:

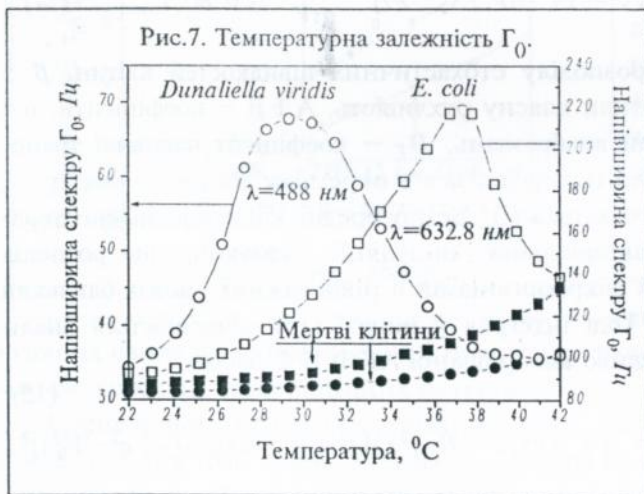
$$S = \sum_{\tau=0}^{\tau=k\tau_0} S(\tau), \quad (17)$$

де τ_0 - мінімальний час затримки, k - число ординат вимірної АКФ ІРС (число використаних каналів корелометра).

У дослідах з мікроорганізмами використовувались як кореляційні, так і спектральні режими ФКС. Безумовно, спектральні вимірювання значно складніші, ніж кореляційні, але вони дозволяють простіше отримати потрібну інформацію. Так, наприклад, щоб визначити розподіл швидкостей власного руху клітин із вигляду кореляційної функції, треба застосувати досить складну комп'ютерну програму лінійних, або кубічних сплайнів. Тим часом цей же розподіл отримується простим

поточковим диференцируванням гетеродинного спектру розсіяного клітинами світла. Втім, і спектральними, і кореляційними вимірюваннями упевнено фіксується зовнішній вплив на клітинну популяцію.

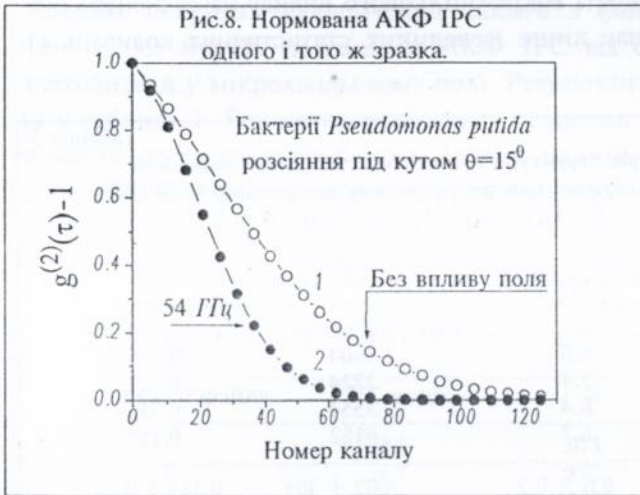
Зокрема, на рис.7



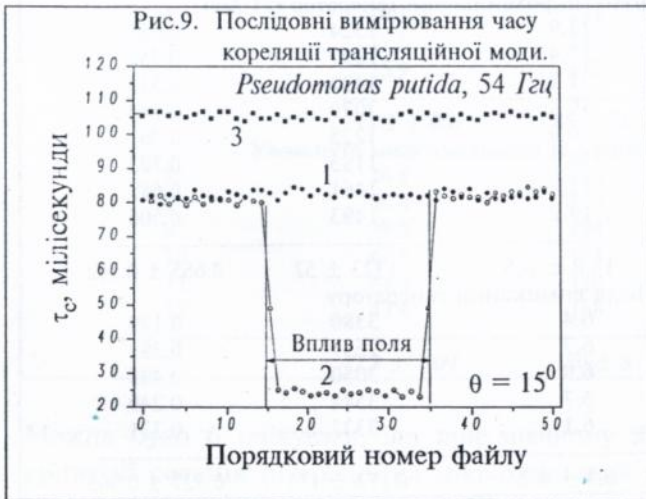
подано температурну залежність напівширини Γ_0 спектру світла, розсіяного культурами *Dunaliella viridis* і *E.coli*. Із одержаних даних легко визначити температурні інтервали максимальної рухливої активності для обох популяцій. До речі, культура еукаріот *Dunaliella viridis* виявилась фототактильною до світла гелій-неонового лазера. Тому у дослідах із клітинами *Dunaliella viridis* був використаний аргоновий лазер ($\lambda = 488$ нм), на випромінювання якого культура не реагує. Подальший матеріал глави стосується впливу мікрохвильового електромагнітного випромінювання на мікробіологічні об'єкти.

Іще до початку фотон-кореляційних вимірювань за допомогою цитофлуориметру «Erics C Coultronics» (Франція) було показано, що 30-хвилинне опромінювання культури *Dunaliella viridis* мікрохвилями час-

тотою 37.5 Гц призводить до зміни розподілу клітин за розмірами в опромінованій зоні. Так було з'ясовано, що мікробіологічна популяція відгукується на мікрохвильовий вплив, і цей факт виявився сильним стимулом до постановки ФКС-експерименту. Було випробувано багато різноманітних схем застосування ФКС в її спектральних і кореляційних варіантах і, треба сказати, що всі, без винятку, досліди підтвердили



існування явища рецепції мікрохвильового електромагнітного поля мікробіологічними об'єктами. Спеціальними дослідими було доведено, що мікрохвильовий вплив є нетепловим, і що термо- і радіорецептори бактерій (принаймні у *E.coli*) не тотожні.



Остаточна схема експерименту приведена на рис.1, тільки замість розчину білка у кюветі знаходилась суспензія рухливих мікроорганізмів. Вплив мікрохвильового поля на популяцію бактерій (один і той же зразок) помітно навіть при візуальному порівнянні виду

відповідних кореляційних функцій (див. рис.8). Зокрема, профіль кривої 2 (рис.8) ясно вказує, що дія мікрохвиль призводить до значного

збільшення швидкості стохастичних рухів бактерій *Pseudomonas putida*. На рис. 9 подано значення середнього за розподілом часу кореляції τ_c трансляційних бактеріальних рухів, одержаного при послідовному автоматизованому вимірюванні 50-ти АКФ ІРС живими (1, 2) і мертвими (3) клітинами *Pseudomonas putida* (1 – усі 50 файлів виміряні без вмикання поля; 2, 3 – поле вмикалось під час вимірювання з 14-ого по 34-тий файл). У відсутності мікрохвильового впливу на суспензію рухливої культури, τ_c зазнає лише невеликих статистичних коливань (1, рис.9).

Таблиця 2

Значення параметрів структури і динаміки суспензії *Pseudomonas putida* (10^5 кл/мл), одержані при послідовному вимірюванні АКФ ІРС при 22 °С ($D_T = 0.33 \cdot 10^{-8} \text{ см}^2 \text{ с}^{-1}$, $\tau_0 = 2 \text{ мс}$, $\theta = 15^\circ$).

номер файлу	V_0 , мкм/с	S	β
1	5.9	4365	0.303
2	6.6	3604	0.285
3	7.4	2724	0.235
4	6.4	3554	0.316
5	6.7	4182	0.157
6.6 ± 0.2			3602 ± 305
0.283 ± 0.042			
Увімкнуто мікрохвильовий генератор (54 Гц)			
6	17.9	1324	0.658
7	18.4	1397	0.752
8	21.3	1422	0.514
9	19.4	2079	0.744
10	16.9	1225	0.761
11	19.1	1185	0.702
12	18.3	1461	0.685
13	19.2	1493	0.506
18.8 ± 0.5			1323 ± 52
0.665 ± 0.102			
Після вимикання генератору			
14	6.4	3380	0.129
15	6.7	2557	0.392
16	6.9	3050	0.495
17	5.7	3544	0.249
18	6.1	3337	0.371
6.4 ± 0.2			3173 ± 173
0.327 ± 0.063			

При проведенні повторної серії вимірювань на тому ж зразку, під час дії поля τ_c зменшується більш ніж у два рази, відновлюючи своє початкове значення майже одночасно із припиненням дії поля (2, рис.9).

Добавлення 20 мкл етилового спирту на 1 мл суспензії призводить до повної втрати клітинами власної рухливості і відсутності будь-якої реакції на дію мікрохвильового випромінювання (3, рис.9). Час накопичення АКФ ІРС для одержання одного файлу даних і його запису у магнітну пам'ять складає приблизно 1 хвилину. Отже під час автоматизованих вимірювань мікрохвильовий генератор можна увімкнути на останніх секундах накопичення любого з файлів і тоді в наступні файли вже будуть потрапляти АКФ ІРС від суспензії бактерій, що знаходиться у мікрохвильовому полі. Результати такого досліді наведені у таблиці 2. Генератор мікрохвиль працював під час вимірювання з шостого по тринадцятий файл. Звертає на себе увагу швидка релаксація суспензії після припинення мікрохвильового впливу.

Таблиця 3

Значення параметрів структури і динаміки суспензії *Pseudomonas putida* (10^5 кл/мл), одержані при послідовному вимірюванні АКФ ІРС при 43 °С ($D_T = 0.61 \cdot 10^{-8} \text{ см}^2 \text{ с}^{-1}$, $\tau_0 = 2 \text{ мс}$, $\theta = 15^\circ$).

номер файлу	V_0 , мкм/с	S	β
1	18.8	673	0.432
2	16.7	832	0.417
3	15.4	905	0.431
4	19.1	754	0.398
5	17.6	730	0.412
6	15.9	817	0.372

	17.2 ± 0.6	785 ± 33	0.412 ± 0.009
Увімкнуто мікрохвильовий генератор (54 Гц)			
7	40.8	208	0.766
8	46.4	153	0.699
9	38.9	194	0.751
10	42.6	175	0.736
11	44.5	180	0.781
12	43.4	168	0.728

	42.8 ± 1.09	180 ± 8	0.743 ± 0.012

Можна було б очікувати, що при значному збільшенні температури суспензії реакція популяції на мікрохвильовий вплив послабиться. Та дані таблиці 3 вказують на інше. Кінестезична реакція бактерій навіть при температурі 43 °С залишається значною. Ці та інші досліді з бактеріями *Pseudomonas putida*, досліді з клітинами *Dunaliella viridis*, *E.coli*, *Proteus vulgaris* переконливо доводять, що реакція популяції мік-

роорганізмів на вплив електромагнітних мікрохвиль складаєть з двох, одночасно протікаючих, процесів: різкої зміни швидкості стохастичних рухів і залишення клітинами опромінюваної зони (зменшення S і відповідне збільшення β в таблицях 2, 3).

Отже під дією мікрохвильового випромінювання виникає типовий бактеріальний таксис (колективний рух клітин уздовж градієнту ефектору), який, відповідно до природи ефектору, має бути названим *радіо-таксисом*. Крутий градієнт мікрохвильового поля утворюється автоматично, за рахунок інтенсивного поглинання випромінювання водним середовищем. На закінчення глави подано опис розробленого і виготовленого оптично-електронного пристрою для незалежного доказу існування явища радіотаксису. За його допомогою було зафіксовано виникнення градієнту концентрації рухливих клітин у видовженій вузькій кюветі (довжина – 20 мм, висота – 10 мм, ширина – 1 мм) з бактеріями *Pseudomonas putida* та *E.coli* при опромінуванні її мікрохвилями перпендикулярно до великої бокової грані (10x20 мм). Опромінування протилежної грані викликає інверсію знаку градієнта.

ОСНОВНІ ВИСНОВКИ

1. Створено інформаційно-вимірювальний комплекс для цілей фотон-кореляційної спектроскопії (ФКС) в її різноманітних модифікаціях, в залежності від вирішуємої біофізичної задачі. Оптичний модуль комплексу дає можливість використовувати лазерні джерела різної потужності і частоти генерації, що дозволило дослідити широкий спектр рідких біологічних систем: від розчинів індивідуальних білків до суспензій відносно крупних клітин. Розроблений і реалізований засіб магнітно-оптичної стабілізації світлового потоку лазерів значно поліпшив якість одержуємої спектральної інформації. Оригінальне системне матзабезпечення дозволило повністю автоматизувати вимірювальний процес, а розроблений пакет програм користувача – провадити всю необхідну обробку експериментальних даних. Це дозволило одержати абсолютно нову інформацію про динамічні властивості ряду рідких біологічних систем.

2. Досліджені загальні закономірності формування фотон-кореляційних спектрів рідких біологічних систем і на їх основі розроблені експериментальні та комп'ютерні підходи до визначення структурно-динамічних параметрів об'єкту. Зокрема, досліджені температурні кон-

формаційні переходи у фібриногені і його Д-фрагменті; проведено спостереження біологічної полімеризації фібриногену під дією рептилази, де вдалося зареєструвати кінетику раннього етапу фібриногенезу, що недоступна спостереженню іншими методами.

3. Отримані та проаналізовані спектральні і кореляційні характеристики світла, розсіяного біологічними системами, що знаходяться під впливом низькоенергетичного збурення. Показано, що ФКС білка, що знаходиться під впливом мікрохвильового електромагнітного випромінювання, дає принципово нову для об'єктів такого рівня інформацію про внутрішні динамічні моди молекули. Одержані результати лягли в основу методу радіочастотного зондування динамічної структури (РЗДС) білка; проведені РЗДС-експерименти дозволили поставити питання про можливе існування динамічного філогенезу білків, еволюційно не зв'язаного з їх структурним філогенезом. Зокрема, було показано, що структурно подібні (за ознаками третинної структури) редуктази не виявляють подібності з ознаками внутрішньомолекулярної динаміки (принаймні за даними РЗДС).

4. Визначені параметри мікроструктури і динаміки моделей везикулярних біологічних мембран – ліпосом. Зокрема, показано, що використання ФКС у комплексі із традиційною оптичною спектроскопією дозволяє одержати характеристики мікроструктури рідких біологічних систем, раніш недоступні для визначення оптичними методами. Дослідження кутової залежності середнього за розподілом часу кореляції дифузійного руху ліпосомальних об'єктів дозволяє визначити характер агрегаційного процесу і однозначно відповісти на питання: що ж трапилось у агрегуючій суспензії – злиття ліпосом із утворенням нових укрупнених моночасток, чи багаточасткова аглютинація без об'єднання бішарової ліпідної субстанції?

5. Методами ФКС досліджена стохастична динаміка мікроорганізмів – потенціальних мікробних сенсорів. Показано, що вплив мікрохвильового електромагнітного поля на популяції плаваючих бактерій є нетепловим і викликає істотні зміни клітинного руху. Докладний аналіз цих змін методами ФКС призвів до висновку про існування двох видів відгуку системи на мікрохвильовий вплив: різкої зміни параметрів стохастичного руху і повільного переміщення популяції, як цілого. Таким чином, виявлено нове явище, що отримало назву *радіотаксису*, відповідно до природи ефектору, що спричиняє це явище. Для неза-

лежного доказу існування радіотаксису було розроблено і створено спеціальний оптичний пристрій, на якому цей доказ і було одержано.

Автор усвідомлює, що у виконаній роботі далеко не вичерпані як можливості фотон-кореляційної спектроскопії, так і добір біологічних об'єктів, для дослідження яких може бути використана ця високо-продуктивна наукова методика. Зокрема, не розглянуті роботи по внутрішній динаміці ДНК, де завдяки великому розміру молекул ФКС може застосовуватись без будь-яких додаткових модифікацій. Поза увагою автора залишились кореляційна флуоресцентна спектроскопія і електрофоретичне розсіяння світла; не вдалося також реалізувати багатообіцяючі можливості методу взаємних кореляцій і деякі нові ідеї в частині математичної обробки результатів вимірювань. Але велика увага і зацікавленість методом з боку спеціалістів із різних наукових установ України дозволяє сподіватись, що згадані вище аспекти ФКС іще чекають на своїх дослідників.

За час досліджень, результати яких викладені у дисертації, автору довелось спілкуватись і співпрацювати з багатьма вченими – фізиками, математиками, кібернетиками, біофізиками, біохіміками, мікробіологами, спеціалістами з електроніки, - чие доброзичливе ставлення в значній мірі сприяло успішному проведенню широкого кола трудомістких досліджень. Перші слова подяки автор адресує доктору фіз.-мат.наук В.А.Носкіну, який познайомив автора з чудовим методом ФКС. До створення власної установки автор багато працював на ФК-апаратурі Ленінградського Інституту ядерної фізики ім.Б.П.Костянтинова (Гатчина), де завжди відчував незмінну доброзичливість співробітників Сектору конденсованого стану: його керівника доктора фіз.-мат.наук, проф.Г.М.Драбкіна (на жаль, нині покійного), А.В.Ломакіна, Ю.С.Капшина, М.А.Іванової, М.М.Агамаліяна, В.В.Клюбіна, Г.Е.Шмельова, П.Д.Добичіна, А.Д.Лебедева, Т.Г.Брагинської, Т.М.Решетнікової, А.Р.Клейнера.

Під час створення експериментальної установки велика допомога була надана з боку Горьковського науково-дослідного і приладобудівного інституту (ГНДПІ) НПО «Кварц», особливо керівником Сектору програмно-технічних засобів (нині – директором) В.М.Осокіним.

В справі опанування кореляційною виміральною технікою автору ефективно сприяли співробітники СКБ ПО «Краснодарський ЗВП» П.А.Вітковський, А.П.Котов, О.В.Лаптев.

Теплі слова подяки автор адресує людям, що увесь час знаходились поруч, – співробітникам лабораторії спектроскопії (потім відділу біофізики) Інституту біохімії ім.О.В.Палладіна НАНУ – В.Г.Скрипченко, А.В.Мостовій, Н.В.Щербацькій, А.І.Караченцевій, Н.Н.Косицькому, З.Н.Воловик, А.П.Демченко, О.Г.Костржевській.

Автор щиро зичить своїм колегам, плідне спілкування з якими допомогало не тільки адекватно усвідомлювати одержані результати, але й формувати ідеї нових експериментів, – професорам Л.М.Блінову (Москва), І.Н.Сердюку (Пушино), С.П.Сітьку (Київ), В.Н.Єжову (Ялта), кандидатам фіз.-мат.наук. І.Г.Єршу (Новосибірськ), А.А.Адаменко (Київ), к.т.н. В.С.Грому (Київ), к.т.н. Зінькевічу Е.Л. (Ялта).

Автор вважає за свій обов'язок подякувати: системних програмістів А.І.Синенко і А.Г.Краковського за підтримку постійної роботоздатності програмно-обчислювального модулю експериментальної установки; О.В.Борисову (Інститут ботаніки НАНУ) та О.Ю.Скрипець (Інститут мікробіології НАНУ) за підготовку мікробіологічних об'єктів; Т.І.Соркіну (Інститут біоорганічної хімії РАН, Москва) за надання дефіцитних реактивів, зокрема L-серину для дослідів щодо впливу інгібіторів на термо- і радіорецепцію прокариот.

ОСНОВНІ МАТЕРІАЛИ ДИСЕРТАЦІЇ ОПУБЛІКОВАНІ
В РОБОТАХ:

1. *Левчук Ю.М.* Инфрарчервоні спектри біологічно важливих стеринів/Тез.дол. 1-ого Укр. біохім. з'їзду.— Чернівці, 1965.— С. 215-216.
2. *Левчук Ю.Н.* Дисперсия оптического вращения провитаминов и витаминов D₂ и D₃/Мат.сов.по химии и биохим.витаминов Д.— Киев: Наук.думка, 1966.— С. 19-21.
3. *Левчук Ю.Н., Цымбал И.Ф.* Стерические эффекты в инфракрасных спектрах провитаминов D₂ и D₃/там же.— С. 21-22.
4. *Левчук Ю.Н., Цымбал И.Ф.* Инфракрасные спектры фотодериватов 7-дегидрохолестерина/там же.— С. 22-23.
5. *Левчук Ю.Н.* Интегральные интенсивности полос деформационных колебаний CH₂- и CH₃-групп в инфракрасных спектрах некоторых стероидов// Журн.прикл.спект. — 1968.— 9, № 3. — С. 663-665.
6. *Левчук Ю.Н.* Инфракрасные спектры стероидов//Успехи химии. —1968.— 37, вып. 2. — С. 324-351.
7. *Левчук Ю.Н., Яхимович Р.И.* Характерические инфракрасные частоты бензоильной группы 3-бензоатстеринов//Журн.прикл.спект. — 1969. — 11, вып.5. — С. 909-912.
8. *Короткоручко В.П., Проценко Б.О., Рожко О.Т., Федорова Г.П., Кузьменко І.І., Левчук Ю.Н.* Спектрополяриметричні дослідження білків сировотки крові при нормальному і злоякісному рості//Укр. біохім. журн. — 1969. — № 2. — С. 135-140.
9. *Даценко З.М., Вендт В.П., Левчук Ю.Н.* Новое антирахитическое вещество из облученной кожи/Второй всесоюзн.биохим.съезд. Тез. докладов., Ташкент, Изд. Фан.— 1969. — С. 17-18.
10. *Левчук Ю.Н.* Полиморфизм кристаллических стеринов и его проявление в инфракрасных спектрах/В кн.:Спектроскопия молекул и кристаллов.— Киев: Изд. «Наук.думка», 1969. — С. 360-361.
11. *Левчук Ю.Н., Педенко Ф.И.* Фотоэлектрический микрополяриметр с магнитно-оптической ячейкой Фарадея/там же — 1969.— С. 459-461.
12. *Левчук Ю.Н., Халимонова И.Н.* Инфракрасное поглощение в полосах валентных колебаний С—ОН ненасыщенных стеринов//Журн. прикл. спектр. — 1969. — 11, вып.1. — С. 144-147.

13. Левчук Ю.Н., Цымбал И.Ф. Спектрометрическое определение кислород-содержащих групп в молекулах стероидов/ Тез. докл. Второго Всесоюзн. биохим. съезда.— Ташкент, Изд.Фан. — 1969. — С. 75.

14. Левчук Ю.Н. Дисперсия оптического вращения стероидов с различными хромоформами//Химия природн. соедин.— 1969.— вып.1.— С. 36-39.

15. Свищук А.А., Середюк Л.С., Левчук Ю.Н., Колесникова С.Г. Стерини гриба *Stahyobotrys alternaus*//там же.—1970.—вип.3.—С. 319-323.

16. Левчук Ю.Н., Коваль В.Г., Цымбал И.Ф. Проявление эффектов сопряжения и внутримолекулярной водородной связи в ИК спектрах стероидных кетонов//Журн.прикл.спектр. — 1971. — 14, вып.4. — С. 735-738.

17. Левчук Ю.Н., Кузнецов Н.В., Красавцев И.И. ИК спектры монозамещенных 1,4-диоксана//Журн.прикл.спектр. — 1972. — 17, вып. 2.— С. 300-304.

18. Сологуб Л.С., Мощинский С.Д., Иващенко Я.Н., Левчук Ю.Н. Взаимодействие 2,3,5,6-тетрахлорпиримидил-4-сульфенилхлорида с олефинами//Химия гетероцикл. соедин. — 1972. — № 4. — С. 514-519.

19. Шокол В.А., Голик Г.А., Левчук Ю.Н., Егоров Ю.П., Деркач Г.И. Ацидолиз продуктов реакции амидоэфиров алкил-фосфоновых кислот с пятихлористым фосфором//Журн.общ.химии. — 1973.— 503. —С.747-750.

20. Шокол В.А., Голик Г.А., Левчук Ю.Н., Егоров Ю.П., Деркач Г.И. Строение продуктов реакции амидоэфиров алкил-фосфоновых кислот с пятихлористым фосфором//Журн.общ.химии.— 1973.— 503.— С. 267-274.

21. Левчук Ю.Н., Валевиц М.И. Интенсивности линий масс-спектра/Вторая Всесоюзная конференция по масс-спектрометрии. Тез.докл.— Л.: Изд.«Наука», 1974.— С. 127-128.

22. Левчук Ю.Н., Валевиц М.И., Адаменко А.А. Корреляции между параметрами инфракрасных и масс-спектров/там же. — С. 129.

23. Левчук Ю.Н., Маслов Ю.Н. Моменты инерции аминокислот/III Всесоюзная. конф. по спектр. биополимер.Тез.докл.— Харьков, 1977. — С. 68-69.

24. Левчук Ю.Н. Установка для изучения свойств биополимеров в электромагнитных полях промышленной частоты/там же. — С. 69-70.

25. *Левчук Ю.Н.* Измерение электрического дихроизма биополимеров в ИК области спектра. – там же. – С. 71-72.

26. *Левчук Ю.Н., Валевич М.И., Талденко Ю.Д.* Магнитно-оптические поляриметры//Сб. «Оптические и электрооптические методы и приборы анализа состава вещества.» – Киев. – 1977. – С. 48-58.

27. *Левчук Ю.Н., Дышловой В.Д.* Об особенностях низкочастотной диэлектрической дисперсии биологических тканей//Электрон.обр.мат.– 1979. – № 3. – С. 69-73.

28. *Левчук Ю.Н., Дышловой В.Д., Качура В.С., Выборный В.П.* О механизме биологического эффекта электромагнитных полей промышленной частоты//Электронная обр.мат. – 1979, № 6. – С. 64-71.

29. *Левчук Ю.Н.* Оптические методы исследования релаксационных процессов/ в кн.: Спектроскопия молекул и кристаллов. ч.2. – Киев: Наук.думка, 1980. – С. 194-202.

30. *Левчук Ю.Н.* Микроструктура суспензий липидных везикул/ Тез.доклад. IV Международной конф.соц.стран по жидким кристаллам. – Тбилиси, 1981. – С. 189-190.

31. *Левчук Ю.Н.* Оптическое исследование микроструктуры суспензий липосом//Оптика и спектр. – 1981.– 51, вып. 6. – С. 1105-1107.

32. *Левчук Ю.Н., Федоров А.Н., Курский М.Д.* Размер Mg^{2+} , Ca^{2+} – АТФ-азы по данным спектроскопии оптического смешения/IV Всесоюзн. конф. по спектроскопии биополимеров. Тез. докл.– Харьков, 1981. – С. 110-111.

33. *Бондарь О.П., Левчук Ю.Н., Холодова Ю.Д.* Применение флуоресцентного зонда астрафлксина для исследования плотности поверхностных зарядов в дисперсных системах/Всесоюзн. совещание “Люминесцентный анализ в медицине и биологии и его аппаратурное обеспечение”. – Тез.докл. – Рига, 1981. – С. 107-108.

34. *Левчук Ю.Н., Воловик З.Н.* Спектроскопическое определение содержания липидов в суспензиях липосом//Укр.биохим.журнал. – 1982. – 54, № 1. – С. 66-68.

35. *Левчук Ю.Н., Воловик З.Н., Щербацкая Н.В.* Оценка размеров бислойных липосом по оптической плотности и показателю преломления//Укр.биохим. журнал. – 1983. – 55, № 2. – С. 191-193.

36. *Левчук Ю.Н., Воловик З.Н.* Размеры лецитиновых липосом, образующихся при воздействии ультразвука//Биофизика.– 1983. – 28, вып. 3. – С. 266-269.

37. Романютина Л.В., Мишунина И.И., Журба А.С., Левчук Ю.Н., Фиалковский Р.В. Исследование структуры коллоидных дисперсий сульфонатных присадок с различным уровнем щелочности//Коллоидн. журн. — 1987, вып.1. — С. 188-192.

38. Лебедев А.Д., Левчук Ю.Н., Ломакин А.В., Носкин В.А. Лазерная корреляционная спектроскопия в биологии/Киев: Изд.Наукова думка, 1987. — 256 с.

39. Караченцева А.И., Левчук Ю.Н. О возможности наблюдения внутренних релаксационных мод белков методом оптического смешения/VI конференция по спектроскопии биополимеров. Тез.докл. — Харьков, 1988. — С. 157.

40. Левчук Ю.Н., Осокин В.М. Автоматизированный спектрометр квазиупруго рассеянного света/Тез. докл. 20-ого Всесоюзного съезда по спектроскопии, ч.2.— Киев: Наук.думка, 1988. — С. 413.

41. Левчук Ю.Н. Спектроскопия флуктуаций поляризации света/там же. — С. 452.

42. Караченцева А.И., Левчук Ю.Н. Подвижные микроорганизмы — сенсоры высокочастотного электромагнитного и биологического поля// Биополимеры и клетка. — 1989. — 5, № 4. — С. 76-83.

43. Левчук Ю.Н., Караченцева А.И. Радиорецепция высокочастотного электромагнитного поля клетками *Escherichia coli*//Докл. АН УССР.— 1989. — Сер.Б., № 5. — С. 65-69.

44. Чаяло П.П., Жукова Т.А., Левчук Ю.Н. О влиянии электромагнитных излучений миллиметрового диапазона на активность и физико-химические характеристики холинэстеразы в модельных опытах/Фундаментальные и прикладные аспекты применения миллиметрового излучения в медицине. — I Всесоюзный симпозиум с международным участием. — Киев, 1989. — С. 37-38.

45. Левчук Ю.Н., Караченцева А.И., Осокин В.М. Изучение радиотаксиса *Dunaliella viridis* и *E.coli* методом взаимной корреляции интенсивностей лазерных пучков/там же. — С. 118-120.

46. Левчук Ю.Н., Осокин В.М. Информационно-измерительный комплекс для анализа спектров квазиупруго рассеянного света// Техника средств связи. — 1989. — сер. РИТ, вып. 3. — С. 72-78.

47. Левчук Ю.Н., Караченцева А.И., Андреев Е.А. Радиотаксис клеток водоросли *Dunaliella viridis*// Электронная обработка материалов. — 1990. — № 6 (154). — С. 53-57.

48. Левчук Ю.Н., Ноткин В.Л., Ноткин Г.Л., Осокин В.М., Оффенгенден С.Р. Программно-технический комплекс для обеспечения корреляционного и спектрального анализа оптических сигналов/ Материалы 3-ей Межреспубликанской школы-семинара «Научприбор-90». — Судак. — 1990. — С. 24.

49. Левчук Ю.Н., Ноткин В.Л., Ноткин Г.Л., Осокин В.М., Оффенгенден С.Р. Программное обеспечение двухмашинного комплекса для обработки физической информации/Автоматизация научных исследований в ядерной физике и астрофизике. Тез. докл. IV Всесоюзной школы. — Ужгород, 8-13 октября. — 1990. — С. 102-103.

50. Левчук Ю.Н., Оффенгенден С.Р. Программное обеспечение системы для регистрации информационного поля человека/8-ой Международный симпозиум по проблемам модульных информационно-вычислительных систем и сетей. — ИВС'91. Тез. докл. — Дубна. — 1991. — С. 96.

51. Fedorchuk A.G., Skivka L.M., Stolyarov Z.E., Levchuk Yu.N., Mostovaya A.V. Influence of extremely high frequency low intensity electromagnetic radiation on the cytotoxic activity of human natural killer cells//Biophysics. — 1992. — Vol.37, No.5. — P. 853-857.

52. Левчук Ю.Н. Внутримолекулярное движение в белке//Укр.биохим.журнал. — 1993. — 65, № 2. — С. 3-16.

53. Левчук Ю.М., Скрипець О.Ю., Мостова А.В., Колісніченко А.К. Оптична система реєстрації біогенного впливу/Мат. I Українського біофізичного з'їзду. — Київ, — 1994. — С. 145-146.

54. Левчук Ю.М. Дослідження конформаційної динаміки білка через флукутації поляризації оптичного випромінювання/там же - С. 146-147.

55. Левчук Ю.Н., Мостовая А.В., Скрипец Е.Ю. Исследование структуры и динамики суспензии *Pseudomonas putida* методами лазерной корреляционной спектроскопии // Докл.НАНУ. — 1995. — № 7. — С. 138-141.

56. Левчук Ю.Н., Мостовая А.В., Скрипец Е.Ю., Гранцев Д.В. Влияние микроволнового электромагнитного поля на структуру и динамику суспензии *Pseudomonas putida* // Докл.НАНУ. — 1995. — № 8. — С. 132-136.

Левчук Ю. Н. «Фотон-корреляционная спектроскопия жидких биологических систем». Диссертация на соискание ученой степени доктора физико-математических наук по специальности 01.04.25 – биофизика. (Автор: – ст.н.с. Института биохимии им.А.В.Палладина Национальной Академии наук Украины, канд.физ.-мат.наук (044 – оптика, 1969); 86 печатных работ, 1 монография (в соавторстве), 3 авторских свидетельства). Харьковский гос.университет, Харьков, 1995.

Защищается 56 научных работ, где исследованы методами фотон-корреляционной спектроскопии (ФКС) жидкие биологические системы: индивидуальные белки, модели биологических мембран – липосомы, микроорганизмы прокариот и эукариот.

Получение новой биофизической информации обеспечено за счёт усовершенствования собственно ФКС, её объединения с методами традиционной оптической спектроскопии, внесения в исследуемые системы слабого возмущающего фактора – малоинтенсивного монохроматического электромагнитного излучения из диапазона 37.5-75 ГГц, применения усовершенствованных измерительных и вычислительных процедур.

Обнаружено новое явление – **радиотаксис**, заключающееся в нетепловой стимуляции микроволновым электромагнитным полем стохастического и коллективно-го движения популяции микроорганизмов.

Levchuk Yu. N. «**Photon Correlation Spectroscopy of liquid biological systems**». Thesis for a Doctor's degree of Physical and Mathematical Sciences (Author: Senior Scientific Worker (A.V.Palladin Institute of Biochemistry of National Academy of Sciences of Ukraine), Candidate of Physical and Mathematical Sciences (Ph.D.). The total number of publications includes 1 monograph, 86 articles and 3 inventions).

The fifty-six defended scientific works contain the results of investigations by methods of photon correlation spectroscopy (PCS) of liquid biological systems as individual proteins and biological membranes models: liposomes, procariotic and eucariotic microorganisms.

The obtaining of new biophysical information is provided by the improvement of the PCS itself and its cooperation with the traditional optical spectroscopy methods as well as the introduction into the researched systems a weak disturbing factor as low intensive electromagnetic radiation in the range of 37.5-75 GHz together with the improvement of measuring and calculation procedures.

A new effect – **radiotaxis** was discovered. It consists in the nonthermal stimulation of the stochastic and collective movements of microorganism population under the influence of microwave electromagnetic field.

Ключові слова: розсіяння світла (РС), фотон-кореляційна спектроскопія (ФКС), автокореляційна функція (АКФ), спектр потужності, трансляційна дифузія, внутрішня динаміка, мікрохвильове електромагнітне випромінювання, білки, ліпосоми, мікроорганізми.

445091

Безкоштовно

AB 33.366