

Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна
Міністерство освіти і науки України

Кваліфікаційна
наукова праця
на правах рукопису

Кожешкурт Валентин Олександрович

УДК 577.359:537.311.31:57.013

ДИСЕРТАЦІЯ
«ВЗАЄМОЗВ'ЯЗОК ЕЛЕКТРОПРОВІДНОСТІ
БІОЛОГІЧНИХ СЕРЕДОВИЩ
З ФУНКЦІОНАЛЬНОЮ АКТИВНІСТЮ»

Спеціальність 03.00.02 – «Біофізика»
(Фізико-математичні науки)

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата фізико-математичних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело
_____ В. О. Кожешкурт

Науковий керівник: Катрич Віктор Олександрович, доктор фізико-математичних наук, професор

Харків - 2021

АНОТАЦІЯ

Кожешкурт В. О. Взаємозв'язок електропровідності біологічних середовищ з функціональною активністю. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата фізико-математичних наук за спеціальністю 03.00.02 – біофізика (Фізико-математичні науки). – Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна Міністерства освіти і науки України, Харків, 2021.

Дисертацію присвячено дослідженню взаємозв'язку функціональної активності, по таким показникам, як проліферативна активність клітин кісткового мозку в первинній культурі, наявність такої патології, як фіброз печінки, склад біологічних рідин на прикладі молозива з електропровідністю. Досліджували електропровідність простих водних систем (суспензія наночастинок), біологічних рідин (молозива від різних корів), культури клітин кісткового мозку та різних тканин (з'єднувальної, м'язової, епітеліальної). Для визначення зазначених параметрів об'єктів дослідження використовували біофізичні, біохімічні та цитологічні методи досліджень.

Біофізичні процеси супроводжуються рухом, перерозподілом зарядів, зміненням іонного складу, зміненням рухливості вільних носіїв заряду, що має відображення на електрофізичних параметрах. Це вказує на принципову можливість інтерпретації результатів вимірювання як індикаторів біофізичних та фізіологічних процесів. Однак їх зв'язок є складним та недостатньо вивченим для однозначної інтерпретації. Тому в більшості прикладних застосувань автори показують принципову можливість такої інтерпретації та зводять задачу в рамках простої моделі до дослідження зв'язку електропровідності з одним обраним параметром, який має певний прикладний інтерес, вважаючи решту параметрів фіксованими.

Вперше запропоновано метод широкосмугової імпедансної спектроскопії для використання як експрес-методу при оцінці якості молозива, функціональної

активності клітинних суспензій (різна ступінь проліферативної активності) на прикладі клітин кісткового мозку, та при оцінці фізико-хімічних характеристик суспензій наночастинок.

Відмінності електропровідності різних біологічних середовищ вказують на кілька важливих обставин. По-перше, біологічні середовища багатоконпонентні і динамічні, в тому сенсі, що в них можуть утворюватися і розпадатися надмолекулярні компоненти. Аналітичні методи аналізу таких середовищ являють великі труднощі. У зв'язку з цим, біофізичні методи можуть бути більш перспективними в характеристиці інтегральних показників таких біологічних середовищ. По-друге, на електропровідність біологічних середовищ великий вплив робить наявність компонентів з діелектричними властивостями і, перш за все, ліпідів і мембранних структур. Оскільки між мембранами і іншими компонентами біологічних середовищ можуть здійснюватися міжмолекулярні взаємодії на основі гідрофобних, водневих і електростатичних взаємодій, тобто можуть формуватися надмолекулярних структури, які будуть впливати на електропровідність. В цьому відношенні можна вважати, що електропровідність біологічних середовищ є інтегральною характеристикою не тільки електролітного складу, а й мало досліджених структурних особливостей. Оцінка електропровідності культуральних середовищ може бути використана в клітинних біотехнологіях для оцінки кількості культуральних середовищ.

Метод імпедансної спектроскопії може бути узагальнено при дослідженні залежності діелектричної проникності різних матеріалів від частоти, температури, тиску та інших видів впливів, що необхідно при розрахунку електродинамічних структур і при створенні надширокосмугових НВЧ випромінювачів, поміщених в матеріальне середовище з порядку спадання з частотою діелектричної проникністю.

Отримані значення діелектричної проникності біологічних тканин можуть бути використані для розрахунків систем радіотермометрії.

Обґрунтовано перспективи використання НВЧ радіометрії для визначення глибинних температур біологічних об'єктів.

Розглянуто модель розподілу теплових полів всередині біологічного об'єкта при наявності в біологічному об'єкті зон зі зниженою температурою.

Показано, що між іонним складом (вміст іонів кальцію і міді), вмістом реактивних форм кисню, проліферативною активністю клітин кісткового мозку в суспензії і питомою електропровідністю існує складний взаємозв'язок. Фіброз печінки індукує зміну в іонному складі, редокс-системі клітин і спрямованості диференціювання клітин кісткового мозку, і це здійснює вплив на електропровідність суспензії клітин. Для цих змін існує виражений вік-залежний характер. Однак, ці зміни мали різноспрямований характер, тобто патерни цих показників були різними як у тварин різного віку, так і на тлі Cu - індукованого фіброзу у молодих і старих тварин.

Показано, що збільшена кількість іонів кальцію, зменшена кількість продуктів вільнорадикальних реакцій в клітинах кісткового мозку старих тварин супроводжується збільшенням проліферативної активності клітин у первинній культурі, і для суспензії таких клітин характерна підвищена електропровідність у порівнянні з клітинами кісткового мозку, отриманими у молодих тварин. Між проліферативною активністю клітин в культурі і електропровідністю існує взаємозв'язок.

Показали, що електропровідність суспензії наночастинок залежить не тільки від їх кількості в середовищі, але і від розподілу в суспензії та форми, що дозволяє рекомендувати цей метод для контролю характеристик наночастинок. Представлено просту емпіричну формулу для обчислення маси металу в суспензії за даними модуля імпедансу електрохімічної комірки. Зокрема, показано можливість використання імпедансної спектроскопії використано в якості непрямого методу для вимірювання масової частки металу в суспензії в реальному часу.

Показано, що електропровідність молозива залежить від співвідношення компонентів, що входять до його складу (іонний, ліпідний і білковий склад), а також від фізіолого-біохімічних особливостей продуцента молозива. Така індивідуальна особливість складу молозива відображає унікальність метаболізму

особини. Експериментально показано та математично обґрунтовано, що видалення високомолекулярних білків (молекулярна маса більше 10 кДа) сприяє значному збільшенню електропровідності, що свідчить про те, що залишкові низькомолекулярні білки (молекулярна маса менше 10 кДа) забезпечують високий рівень електропровідності. Розроблено метод оцінки за даними широкосмугової імпедансної спектроскопії якості продукції, яку отримують з молозива, при різних термінах зберігання на різних етапах виробництва: вихідна сировина, видалення жиру, отримання фракції з певним складом білків.

Показано, що між електропровідністю знежиреного молозива, низькомолекулярних компонентів молозива і концентраціями в вимірювальній комірі відсутня пряма залежність. Ця залежність є різною для молозива від різних тварин і відображає індивідуальні фізіолого-біохімічні особливості тварин. Показано, що низькомолекулярні компоненти молозива, що мають високу електропровідність, здатні усувати токсичну дію сірчаноокислої міді на організм, механізми якої пов'язані з регулюванням прооксидантно-антиоксидантної системи, тобто зміщенням рівноваги в бік антиоксидантів, і це відображається на електропровідності молозива.

Отримані результати дозволяють рекомендувати метод імпедансної спектроскопії для інтегральної оцінки якості молозива і субстанцій, які отримують з молозива (знежирене молозиво, низькомолекулярні компоненти молозива), а також змін якості молозива в процесі зберігання. Цей метод може бути використаний в біотехнології для оцінки характеристик клітинних культур.

Ключові слова: білковий склад розчинів, електропровідність біофізичних систем, імпедансна спектроскопія, іони, клітини кісткового мозку.

ABSTRACT

Kozheshkurt V. O. The relationship between the electrical conductivity of biological media with the functional activity. – Qualification scientific paper, manuscript.

Thesis for the scientific degree of candidate of sciences in physics and mathematics: specialty 03.00.02 – Biophysics (Physics and Mathematics). – V. N. Karazin Kharkiv National University of the Ministry of Education and Science of Ukraine, Kharkiv, 2021.

The dissertation is devoted to the study of the interrelations of functional activity, in terms of such indicators as the proliferative activity of bone marrow cells in primary culture, the presence of pathologies, in particular liver fibrosis, the composition of biological fluids using the example of colostrum, with electrical conductivity. The electrical conductivity of relatively simple aqueous systems (suspension of nanoparticles), biological fluids (colostrum from different cows), cultures of bone marrow cells and various tissues (connective, muscle, epithelial) were studied. Biophysical, biochemical and cytological research methods were used to determine the parameters of the objects of study.

Biophysical processes are accompanied by motion, redistribution of charges, changes in the ionic composition, changes in the mobility of free charge carriers, which is reflected in the electrophysical parameters. This indicates the fundamental possibility of interpreting the measurement results as indicators of biophysical and physiological processes. However, the interrelation is complex and insufficiently studied for unambiguous interpretation. Therefore, in most applications, the fundamental possibility of such an interpretation is shown and the problem is reduced in a simple model to the study of the interrelation of electrical conductivity with one selected parameter that has some application interest, considering the other parameters fixed.

Differences in electrical conductivity of different biological media indicate several important circumstances. First, biological media are multicomponent and dynamic, in the sense that they can form and break down supramolecular components. Analytical methods of analysis of such environments are very difficult. Therefore, biophysical methods may be more promising in characterizing the integrated performance of such biological environments. Secondly, the electrical conductivity of biological media is greatly influenced by the presence of components with dielectric properties and, above all, lipids and membrane structures. Because intermolecular interactions based on hydrophobic, hydrogen and electrostatic interactions can take place between membranes

and other components of biological media, i.e. supramolecular structures that will affect electrical conductivity can be formed. In this regard, we can assume that the electrical conductivity of biological media is an integral characteristic not only of the electrolyte composition, but also little studied structural features. Estimation of electrical conductivity of culture media can be used in cell biotechnology to estimate the number of culture media.

The method of impedance spectroscopy can be generalized in the study of the dependence of the dielectric constant of different materials on frequency, temperature, pressure and other types of influences, which is necessary in calculating electrodynamic structures and creating ultra-wideband microwave emitters placed in a material medium.

The obtained values of the dielectric constant of biological tissues can be used for calculations of radiothermometry systems.

Prospects for the use of microwave radiometry to determine the depth temperatures of biological objects are substantiated.

The model of distribution of thermal fields inside a biological object in the presence of zones with reduced temperature in a biological object is considered.

It is shown that there is a complex interrelation between the ionic composition (content of calcium and copper ions), the content of reactive oxygen species, the proliferative activity of bone marrow cells in suspension and the electrical conductivity of the cells culture. Liver fibrosis induces a change in the ionic composition, redox system of cells and the direction of differentiation of bone marrow cells, and this affects the electrical conductivity of the cell suspension. For these changes there is a pronounced age-dependent nature. However, these changes were multidirectional, i.e. the patterns of these indicators were different in animals of different ages, and against the background of Cu-induced fibrosis in young and old animals.

It is shown that the increased number of calcium ions, reduced number of products of free radical reactions in bone marrow cells of old animals is accompanied by increased proliferative activity of cells in primary culture, and the suspension of such cells is characterized by increased conductivity compared to bone marrow cells obtained in

young animals. There is an interrelation between cell proliferative activity in culture and electrical conductivity.

It is shown that the electrical conductivity of a suspension of nanoparticles depends not only on their amount in the medium, but also on the distribution in the suspension and the shape, which makes it possible to recommend this method for monitoring the characteristics of nanoparticles. A simple empirical formula for calculating the mass of metal in suspension according to the modulus of the impedance of the electrochemical cell is presented. In particular, the possibility of using impedance spectroscopy as an indirect method for measuring the mass content of metal in the suspension in real time is shown.

It was first shown that the electrical conductivity of colostrum depends on the ratio of its constituent components (ionic, lipid and protein composition), as well as on the physiological and biochemical characteristics of the colostrum producer. This individual feature of the composition of colostrum reflects the uniqueness of the individual's metabolism. It has been experimentally shown and mathematically substantiated that the removal of high molecular weight proteins (molecular weight more than 10 kDa) contributes to a significant increase in electrical conductivity, which indicates that remaining low molecular weight proteins (molecular weight less than 10 kDa) provide a high level of electrical conductivity. A method for assessing the quality of products obtained from colostrum with different durations of storage at different stages of production: raw material, fat removal, obtaining a fraction with a certain protein composition – according to broadband impedance spectroscopy was developed.

It is shown that there is no direct relationship between the electrical conductivity of defatted colostrum, low molecular weight components of colostrum and their concentrations in the measuring cell. This dependence is different for colostrum from different animals and reflects the individual physiological and biochemical characteristics of animals. It is shown that low molecular weight components of colostrum with high electrical conductivity are able to eliminate the toxic effect of copper sulfate on the body, the mechanisms of which are related to the regulation of the prooxidant-antioxidant system, i.e. the shift of balance towards antioxidants.

The results obtained allow us to recommend a method of impedance spectroscopy for an integral assessment of the quality of colostrum and substances obtained from colostrum (skim colostrum, low molecular weight components of colostrum), as well as changes in the quality of colostrum during storage. This method can be used in biotechnology to assess the characteristics of cell cultures.

Keywords: protein composition of solutions, electrical conductivity of biophysical systems, impedance spectroscopy, ions, bone marrow cells.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові праці, в яких опубліковано основні наукові результати дисертації.

Наукові праці в зарубіжних спеціалізованих виданнях, що входять до міжнародної наукометричної бази Scopus

1. Katrich V., Mustetsov N., **Kozheshkurt V.** Improvement of the model of temperature distribution and registration of native radiation of biological objects // Eastern-European Journal of Enterprise Technologies. 2017. Vol. 4, N 5. P. 10-16. *(Особистий внесок здобувача: розробка математичної моделі розподілу температури, розробка математичної моделі реєстрації власного електромагнітного випромінювання біологічних тканин, графічне представлення результатів, участь у обговоренні, переклад на англійську мову)*

2. Kurselis K., **Kozheshkurt V.**, Kiyan R., Chichkov B., Sajti L. Thermally assisted nanosecond laser generation of ferric nanoparticles //Applied Physics Letters. 2018. Vol. 112, N 11. P. 113103. *(Особистий внесок здобувача: розробка експериментальної установки для нагрівання мішені, виконання експериментальної роботи, математична обробка отриманих даних, участь у обговоренні)*

Наукові праці в наукових фахових виданнях України

3. Антоненко Е. А., **Кожешкурт В. А.**, Карпов А. И., Мустецов Н. П. Исследование возможностей метода коаксиального зонда для измерения дисперсии диэлектрической проницаемости биопроб // Прикладная радиоэлектроника: науч.-техн. журн. 2016. Т. 15, № 1. С. 51–56. *(Особистий внесок здобувача: виконано математичну обробку отриманих експериментальних даних з параметрів біологічних тканин та фізіологічних рідин, участь у обговоренні)*

4. Антоненко Є. О., **Кожешкурт В. О.**, Штода Д. О., Катрич В. О. Амплітудно-фазовий детектор для систем діелектричної спектроскопії //

Радіофізика та електроніка. 2020. Т. 25, № 3. С. 68–77. *(Особистий внесок здобувача: виконання експериментальної роботи з вимірювання параметрів детектора, участь у обговоренні результатів)*

5. Антоненко Є. О., **Кожешкурт В. О.**, Штода Д. О., Катрич В. О., Божков А. І. Електромагнітний сенсор для вимірювання діелектричної проникності матеріалів // Вісник Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна. Серія «Радіофізика та електроніка», 2020. випуск 32. С. 51-58. *(Особистий внесок здобувача: виконання експериментальної роботи з дослідження за допомогою розробленого резонатора твердих діелектриків та біологічних рідин, участь у обговоренні результатів)*

Наукові праці, які додатково відображають наукові результати дисертації:

6. **Kozheshkurt V.**, Ivanov I., Antonenko Y., Katrich V., Bozhkov A., Gromovoy T. Devising an express method for estimating the quality of colostrum and its components based on electrical conductivity // Eastern-European Journal of Enterprise Technologies. 2021. Vol. 1, N 11 (109). P. 69-77. (Scopus) *(Особистий внесок здобувача: виконання експериментальної роботи, виконано математичну обробку отриманих даних, участь у обговоренні)*

Наукові праці апробаційного характеру (тези доповідей на наукових конференціях) за темою дисертації

7. **Кожешкурт В. А.**, Антоненко Е. А. Исследование дисперсионной зависимости диэлектрической проницаемости биологических сред // Міжнародна наукова конференція MicroCAD: Секція №15 - Застосування комп'ютерних технологій для вирішення наукових і соціальних проблем у медицині, 18-20 травня 2016.: Харків, НТУ «ХПІ», 2016. С. 36. *(Особистий внесок здобувача: виконання експериментальної роботи, участь у математичній обробці отриманих даних,*

участь у обговоренні результатів, участь у написанні тез, доповідь на конференції)

8. **Kozheshkurt V. A.**, Katrich V. A. Determining the Depth of the Temperature Anomalies in Biological Tissue // 8th International Conference on Ultrawideband and Ultrashort Impulse Signals (UWBUSIS), 5-11 September 2016.: Odessa, 2016. P. 171-174. (Scopus). *(Особистий внесок здобувача: виконання експериментальної роботи, побудовано математичну модель розподілу температури при температурної аномалії, виконано графічну обробку отриманих результатів розрахунків, участь у обговоренні результатів, написання тез, доповідь на конференції)*

9. Katrych V. O., Mustetsov M. P., **Kozheshkurt V. O.**, Slipchenko O. V. Prospects for the use of nanoparticles in medicine // Функциональная база наноэлектроники : IX международная научная конференция. Сборник научных трудов, 18-23 вересня 2017.: Одеса, 2017. С. 62-66. *(Особистий внесок здобувача: виконання огляду літературних джерел за темою оглядової доповіді, участь у обговоренні результатів, написання тез, доповідь на конференції)*

10. **Kozheshkurt V.**, Antonenko Ye., Shtoda D., Slipchenko O., Katrych V. Possibilities of Impedance Spectroscopy for the Study of Bioliquids // 9th International Conference on Ultrawideband and Ultrashort Impulse Signals (UWBUSIS), 4-7 September 2018.: Odesa. 2018. P. 260-263. (Scopus). *(Особистий внесок здобувача: виконання експериментальної роботи, участь у обговоренні результатів, участь у написанні тез, доповідь на конференції)*

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	16
ВСТУП	17
РОЗДІЛ 1. МЕХАНІЗМИ ФОРМУВАННЯ ЕЛЕКТРОПРОВІДНОСТІ БІОЛОГІЧНИХ СИСТЕМ ТА ВПЛИВ ОСНОВНИХ БІОФІЗИЧНИХ ТА ФІЗІОЛОГІЧНИХ ХАРАКТЕРИСТИК БІОЛОГІЧНИХ СИСТЕМ (літературний огляд)	26
1.1. Історія досліджень електропровідності біологічних об'єктів. Дослідження імпедансу тканин і його інтерпретація.	26
1.2. Біоімпедансний аналіз складу тіла людини.	29
1.3. Фактори, що впливають на характеристики електропровідності в біологічних рідинах (молозиво, культуральне середовище, культура клітин)	31
1.4. Взаємозв'язок температури з електропровідністю біологічних систем. . .	36
1.5. Наночастинки і їх вплив на електропровідність біологічних систем. . . .	37
1.6. Взаємозв'язок електропровідності біологічних систем з функціональною активністю.	39
1.7. Взаємозв'язок біологічної активності клітин з іонним складом.	41
Висновки до розділу 1.	43
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ.	44
2.1. Характеристика об'єкта дослідження.	44
2.1.1. Експериментальна схема підготовки тварин до дослідження.	46
2.1.2. Виділення і культивування клітин кісткового мозку <i>in vitro</i>	47
2.1.3. Визначення характеристик клітин кісткового мозку в культури <i>in vitro</i>	47
2.1.3.1. Визначення кількості клітин і їх морфотипів.	47
2.1.3.2. Визначення кількості іонів кальцію і вільних форм кисню.	47
2.1.3.3. Визначення кількості іонів міді.	48
2.1.4. Визначення характеристик цільного молозива, знежиреного молозива і низькомолекулярних компонентів.	48

2.1.4.1. Визначення вмісту і складу білків молозива.	49
2.2. Експериментальна установка для отримання наночастинок методом лазерної абляції.	49
2.3. Пристрої, сенсори та технічні рішення для вимірювання електропровідності твердих та рідких середовищ.	51
2.3.1. Електромагнітний сенсор на мікросмужковому резонаторі для вимірювання діелектричної проникності матеріалів.	51
2.3.2. Метод коаксіального зонда для вимірювання дисперсії електропровідності та діелектричної проникності біопроб.	55
2.3.3. Амплітудно-фазовий детектор для систем діелектричної спектроскопії.	58
2.3.4. Визначення електропровідності рідких біологічних середовищ по S-параметрам за допомогою векторного аналізатора електричних кіл.	59
Висновки до розділу 2.	61
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ.	62
3.1. Експериментальне дослідження електрофізичних параметрів одно- та двокомпонентних модельних середовищ.	62
3.1.1. Експериментальне дослідження електрофізичних параметрів однокомпонентних твердих діелектриків і розчинів хлориду натрію та глюкози у фізіологічних концентраціях.	62
3.1.2. Експериментальне дослідження зв'язку електропровідності суспензій наночастинок з їх фізико-хімічними властивостями.	66
3.1.2.1. Метод підвищення ефективності технології отримання наночастинок методом лазерної абляції шляхом додаткового нагрівання мішені.	66
3.1.2.2. Дослідження зв'язку електропровідності суспензій наночастинок заліза та платини з їх концентрацією та способом просторового розподілу в рідині.	75
3.2. Дослідження електрофізичних характеристик біологічних тканин на прикладі м'язової, з'єднувальної тканин та шкіри.	79

3.2.1. Дослідження електропровідності та діелектричної проникності м'язової, з'єднувальної тканин та шкіри.	79
3.2.2. Модель розповсюдження власного теплового електромагнітного випромінювання від теплових аномалій в біологічних тканин на основі отриманих значень електрофізичних параметрів біологічних тканин.	82
3.2.2.1. Математична модель розподілу температури в біологічній тканині на двокомпонентній моделі.	82
3.2.2.2. Математична модель визначення глибинної температури за власним електромагнітним випромінюванням.	88
3.3. Дослідження характеристик клітин кісткового мозку в первинній культурі у тварин різного віку з Си-індукованим фіброзом печінки.	91
3.3.1. Дослідження характеристик клітин кісткового мозку молодих та старих інтактних тварин (характеристика «вихідного» рівня)	92
3.3.2. Деякі характеристики адаптивної відповіді при індукції фіброзу печінки на рівні кісткового мозку в залежності від сформованих раніше (імпринтованих) характеристик.	97
3.4. Дослідження зв'язку електропровідності компонентів молозива з температурою, складом (цільне молозиво, знежирене молозиво, низькомолекулярні компоненти), концентрацією білків та термінами зберігання.	99
3.4.1. Температурна залежність електропровідності цільного і знежиреного молозива.	100
3.4.2. Електропровідність цільного молозива і компонентів молозива, отриманих у різних корів.	101
3.4.3. Білковий склад цільного молозива і компонентів молозива і його взаємозв'язок з електропровідністю.	102
3.4.4. Математична модель кількості носіїв заряду в розчинах білків.	106
3.4.5. Вплив строків зберігання молозива на електропровідність.	109
3.4.6. Дослідження зв'язку електропровідності знежиреного молозива та низькомолекулярних компонентів молозива з концентрацією білків у досліджуваному середовищі.	112

3.4.7. Вплив низькомолекулярних компонентів молозива на деякі показники редокс-систем організму після інтоксикації сірчаною кислотою	114
Висновки до розділу 3.	120
ВИСНОВКИ.	123
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.	125
ДОДАТОК 1 Список публікацій здобувача за темою дисертації.	143

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

ROS – реактивні форми кисню

XRD – рентгенівська дифрактометрія

ГП – глутатіонпероксидаза

ГПЛ – гідропероксида ліпідів

ЕМП – електромагнітне поле

ККМ – клітини кісткового мозку

НКМ – низькомолекулярні компоненти молозива

СЕМ – сканувальний електронний мікроскоп

ТЕМ – трансмісійний електронний мікроскоп

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. Розвиток патологій, старіння організму, інфекційний процес проявляється в зміні функціональних станів клітин, тканин, біологічних рідин живих систем [1]. З метою визначення тих чи інших функціональних станів біологічних систем ведеться активний пошук біологічних маркерів. Біомаркер – це показник, що вимірюється (біохімічний, генетичний, біофізичний), який вказує на велику ймовірність наявності захворювання і корелює з клінічними або фізіологічними проявами [2]. Нарівні з цим біомаркери використовуються і при оцінці характеристик складу біологічних субстанцій в біотехнології, нанобіотехнології та інших областях наукових і прикладних досліджень [3].

Проблема оцінки функціональних станів полягає в тому, що між геномними і біохімічними показниками дуже часто відсутній прямий взаємозв'язок, тобто вони досить лабільні. У зв'язку з цим необхідний пошук показників, які відображають найбільш загальні інтегральні характеристики складних багатокомпонентних сумішей. При виборі показників потенційних біомаркерів необхідно виходити з того, що для складних систем, в тому числі і біологічних, характерна ієрархічна організація [4], у якій виділяють кілька рівнів: фізико-хімічний рівень (іонний склад, редокс-показники і склад мономерів); молекулярно-генетичний, надмолекулярний, клітинний, тканинний, організмний рівні [5]. Виходячи з цього визначальним або базовим рівнем є іонний склад і редокс-система, оскільки він визначає функціональні характеристики всіх наступних рівнів організації [6].

При оцінці функціональної активності біосистем на базовому рівні може бути використано такий біофізичний метод, як імпедансна спектроскопія біологічних тканин, рідин і сумішей. Цей метод є експресним, не вимагає великих витрат і може бути неінвазивним та високочутливим [7]. Незважаючи на обґрунтованість і переваги перед біохімічними методами аналізу, він не знайшов широкого застосування [8]. Це пов'язано з кількома причинами: з недостатньо розробленою приладовою базою, з відсутністю фундаментальних знань впливу макромолекул і

перш за все білків в рідких середовищах на їх електропровідність і відсутністю досліджень взаємозв'язку електропровідності з функціональною активністю клітин, зокрема проліферативною активністю. У зв'язку з цим метою роботи стало вдосконалення технічних рішень для вимірювання електропровідності і дослідження електрофізичних характеристик біофізичних систем: біологічних рідин, клітинних культур і деяких тканин.

Мета і завдання дослідження. Метою роботи є встановлення взаємозв'язку електропровідності, як біофізичної характеристики біологічних тканин і середовищ, з функціональним станом тканин (зокрема, активності проліферації, наявності фіброзу печінки) і якісним та кількісним складом їх макромолекул (білків, ліпідів).

У межах мети дослідження визначені наступні завдання:

1. Розробка і удосконалення технічних рішень для реалізації методу імпедансної спектроскопії.
2. Дослідження впливу кількісних параметрів (концентрації розчинів) і складу середовищ на електропровідність та діелектричну проникність:
 - а) розчинів глюкози і хлориду натрію;
 - б) біологічних тканин (з'єднувальної, м'язової і епітеліальної);
 - в) суспензії наночастинок.
3. Дослідження взаємозв'язку функціональної активності (зокрема проліферативної активності) клітин кісткового мозку щурів з електропровідністю на прикладі:
 - а) інтактних щурів і щурів з фіброзом печінки;
 - б) інтактних щурів різного віку для дослідження впливу вікових характеристик об'єкта.
4. Визначення електропровідності та білкового складу різних фракцій молозива у різних особин тварин:
 - а) цільного молозива;
 - б) знежиреного молозива;
 - в) молозива, що містить тільки низькомолекулярні білки.

5. Дослідження можливості використання електропровідності для оцінки якості молозива в процесі зберігання.

6. Побудова математичної моделі, що пояснює взаємозв'язок між електропровідністю та молекулярною масою білків молозива. Проведення оцінки біологічної активності низькомолекулярних компонентів молозива.

Об'єкт дослідження – електрофізичні параметри розчинів компонентів біологічних рідин (глюкози, натрій хлориду, білків молозива), біологічних рідин (молозива), біологічних тканин і культур клітин кісткового мозку як інтегральний показник їх стану.

Предмет дослідження – зв'язок електропровідності біологічних рідин з кількісними та якісними характеристиками їх складу та електропровідності культур клітин кісткового мозку з їх проліферативною активністю залежно від віку та наявності фіброзу печінки тварин.

Методи дослідження. Експериментальні дослідження були виконані на наступних модельних середовищах: розчини глюкози та хлорида натрія, суспензії наночастинок металів, зразки біологічних тканин (м'язова, з'єднувальна тканини, шкіра), суспензії клітин кісткового мозку, молозиво та його компоненти.

Експерименти проводили на статевозрілих 3-х місячних і 20-ти місячних самцях щурів лінії *Wistar*. Всі процедури з тваринами виконувалися з дотриманням біоетичних правил [9] і з урахуванням циркадних ритмів формування біологічних відповідей. У кожній віковій групі (молоді – 3-х міс. і старі 20-ти міс.) було по 6 тварин.

Клітини кісткового мозку виділяли з 2-х стегнових кісток щури і культивували в середовищі 199 з NEPES (4-(2-гідроксіетил)-1-піперазинетансульфоновою кислотою) і антибіотиками (8% гентаміцину і 8% стрептоміцину) і 20% інактивованої фетальної телячої сироватки. Культивування в стандартних умовах проводили при 37 °C в атмосфері 5% вуглекислого газу. Кількість клітин і їх морфотипи визначали щодня з 1 по 4 добу культивування. Культуральне середовище при цьому не змінювали. Початкова концентрація клітин кісткового мозку при культивуванні завжди становила 2 млн. кл / мл.

Підрахунок і оцінку життєздатності клітин кісткового мозку тварин проводили, як описано в роботі [10]. Цитологічні препарати фарбували за Романовським – Гімзе, аналізували їх при збільшенні $\times 100$ на мікроскопі ZeissPrimoStariLED (Німеччина).

Для визначення вільних форм кисню до 50 мкл суспензії клітин ($6 \times 10^6/\text{мл}$) вносили 5 мкл робочого розчину Fluo3 з концентрацією 25 мкМ, керуючись рекомендаціями фірми – виробника Cellular ROS Assay Kit – Red (ab186027). Для визначення кількості іонів кальцію в клітинах кісткового мозку вносили 5 мкл робочого розчину. Змішували піпетуванням і інкубували 15 хвилин в темному місці при кімнатній температурі. Візуалізацію клітин проводили методом конфокальної мікроскопії, використовуючи лазерний скануючий конфокальний мікроскоп Olympus FV10i-LIV (Olympus, Японія). За допомогою інтегрованого програмного забезпечення Olympus FV4 .1 проводили вимірювання відносної інтенсивності флюоресценції в кожній окремій клітині з урахуванням фонового світіння.

Для визначення вмісту іонів міді до 500 мкл проб клітин кісткового мозку додавали по 1 мл сірчаної і 1 мл азотної кислот, після чого нагрівали зразок при температурі $140\text{ }^{\circ}\text{C}$ протягом 60 хвилин. Вміст іонів міді визначали на атомно – адсорбційному спектрофотометрі С-115-М1 (Україна) і розраховували вміст іонів міді в мкг/ 10^6 кліток.

Молозиво отримували в Фермерському господарстві «Альфа» (Україна) у корів породи українська молочно-ряба, другого удою після отелення. Знежирення проводили центрифугуванням молозива при 3000 g протягом 20 хвилин при кімнатній температурі. Після видалення жирів зі знежиреного молозива видаляли всі білки з молекулярною масою понад 10 000 Да шляхом мембранної фільтрації.

Після цього зразки висушували на ротаційному апараті. Інтوكсикація проводилася шляхом введення експериментальним тваринам сірчаної міді тричі з інтервалом 48 годин, що становило 5 діб від початку експерименту, в дозі 0,1 мг / 100 г маси тіла. Отримані зразки низькомолекулярних білків розчиняли у фізіологічному розчині і вводили їх експериментальним тваринам *per os* в дозі 0,1 мг / 100 г маси тіла. Через 24 години тварин брали в експеримент. Отримували

сироватку крові і в ній визначали вміст гідропероксидів ліпідів за методом [11] і активність глутатіонпероксидази за методом [12].

Склад низькомолекулярних білків визначали на мас-спектрометрі Autoflex II LRF 20 «Bruker Daltonics» (Німеччина), оснащеному імпульсним азотним лазером ($\lambda = 337$ нм, тривалість імпульсу 3 нс). Отримані результати піддавали статистичній обробці методом тесту Манна – Уїтні з використанням програмного забезпечення Statistica 8.0 (StatSoft Inc., USA). Відмінності між контрольними і експериментальними групами приймалися достовірними при $p < 0,05$ у порівнянні з контрольним варіантом.

Для отримання спектрів електропровідності методом імпедансної спектроскопії рідкі зразки вносили в тефлонову комірку, яка була підключена до двох портів векторного аналізатора «Rohde & Schwarz» ZNB 40 (Німеччина). Вимірювання питомої електропровідності проводили в діапазоні частот 100 кГц – 100 МГц.

Програмне забезпечення аналізатора «Rohde & Schwarz» ZNB 40 дозволяє отримувати автоматично розраховані за S-параметрами значення дійсної і уявної частини опору вимірювальної комірки $\text{Re}(Z \leftarrow S_{21})$ і $\text{Im}(Z \leftarrow S_{21})$. Модуль електропровідності G комірки (в загальному випадку комплексної) був обчислений за формулою:

$$|G| = \frac{1}{\sqrt{\text{Re}(Z \leftarrow S_{21})^2 + \text{Im}(Z \leftarrow S_{21})^2}} \quad (1)$$

Електропровідність вмісту вимірювальної комірки, крім властивостей речовини, визначається геометричними параметрами комірки. Щоб виключити вплив геометричних параметрів, результати були представлені у вигляді значень питомої електропровідності σ :

$$\sigma = k \cdot |G|, \quad (2)$$

де $k = 175 \text{ м}^{-1}$ – коефіцієнт, обчислений для циліндричної комірки місткістю 1 мл, яка використовувалась в експерименті.

Модуль діелектричної проникності зразків було обчислено за формулою:

$$|\varepsilon| = \frac{k \cdot \operatorname{Im}(Z < -S_{21})}{2\pi f \varepsilon_0 \cdot \left(\operatorname{Re}(Z < -S_{21})^2 + \operatorname{Im}(Z < -S_{21})^2 \right)}, \quad (3)$$

де f – частота, ε_0 – діелектрична проникність вакууму.

Наукова новизна отриманих результатів. Наукова новизна результатів дослідження, отриманих особисто здобувачем, полягає у наступному:

- Вперше запропоновано метод широкосмужової імпедансної спектроскопії для використання як експрес-методу при оцінці якості молозива, функціональної активності клітинних суспензій (різні ступені проліферативної активності) на прикладі клітин кісткового мозку та при оцінці фізико-хімічних характеристик суспензій наночастинок.

- Вперше показано, що електропровідність молозива залежить від співвідношення компонентів (іонного, ліпідного і білкового), а отже, від фізіолого-біохімічних особливостей продуцента молозива, зумовлених його унікальним метаболізмом.

- Вперше розроблено метод оцінки за даними широкосмужової імпедансної спектроскопії якості продукції, яку отримують з молозива, при різних термінах зберігання на різних етапах виробництва: вихідна сировина, видалення жиру, отримання фракції з певним складом білків.

- Вперше показано, що низькомолекулярні компоненти молозива, що мають високу електропровідність, здатні усувати токсичну дію сірчанокислої міді на організм, механізм якої пов'язано з регулюванням прооксидантно-антиоксидантної системи, тобто зміщенням рівноваги в бік антиоксидантів, і це відображається на електропровідності молозива.

- Показано, що збільшена кількість іонів кальцію, зменшена кількість продуктів вільнорадикальних реакцій в клітинах кісткового мозку старих тварин супроводжується збільшенням проліферативної активності клітин у первинній культурі, і для суспензії таких клітин характерна підвищена електропровідність у порівнянні з клітинами кісткового мозку, отриманими у молодих тварин.

- Удосконалено технологічний процес отримання наночастинок металів методом лазерної абляції. Показано можливість використання імпедансної

спектроскопії в якості непрямого методу для вимірювання масової частки металу в суспензії в реальному часу. Визначено емпіричну формулу для обчислення маси металу в суспензії за даними модуля імпедансу електрохімічної комірки.

Біоетична експертиза. Роботу з лабораторними тваринами (щурами) проводили відповідно до вимог положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986) та згідно відповідних законів України. Біоетичною комісією НДІ біології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна порушень при проведенні науково-дослідної роботи не виявлено (протокол № 1 від 28 «січня» 2021 р.).

Особистий внесок здобувача. У дисертації використані наукові статті [13-17], інші статті та матеріали тез доповідей на конференціях [18-22] дисертанта. Дисертантом самостійно проведено аналіз літературних даних за темою дисертації, виконано експериментальні дослідження, проведено математичні розрахунки, написано та оформлено розділи дисертації. Обговорення основних положень дисертаційної роботи виконано спільно з науковим керівником д. ф.-м. н., проф. Катричем В. О.

Апробація результатів дослідження. Основні результати дисертації були представлені на конференціях всеукраїнського та міжнародного рівнів: XXIV Міжнародній науково-практичній конференції «MicroCAD-2016» (Харків, 2016); 8th International Conference on Ultrawideband and Ultrashort Impulse Signals (UWBUSIS) (Odessa, 2016); IX международной научной конференции «Функциональная база нанoeлектроники» (Одеса, 2017); 9th International Conference on Ultrawideband and Ultrashort Impulse Signals (UWBUSIS) (Odessa, 2018).

Структура й обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається зі вступу, 3 розділів, висновків, списку використаних джерел та 1 додатку. Обсяг загального тексту дисертації складає 145 сторінок, з них основного тексту 111 сторінок. Робота містить 37 рисунків (із них 3 займають окрему сторінку) та 4 таблиці. Список використаних джерел містить 162 найменування.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційні наукові дослідження проводились протягом 2014 – 2020 років на кафедрі фізичної і біомедичної електроніки та комплексних інформаційних технологій факультету радіофізики, біомедичної електроніки та комп'ютерних систем Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна згідно з планами НДР № ДР 0111U002460 «Розробка методу та експериментального зразка приладу для неруйнівного визначення електродинамічних параметрів фізичних тіл» (здобувач – виконавець); НДР № ДР 0117U004963 «Розробка апаратно-програмного комплексу для широкосмугової імпедансометрії розчинів, суспензій, біологічних тканин і рідин» (здобувач – виконавець).

За тематикою дисертації проведено наукові дослідження «Розробка ефективного методу отримання магнітних наночастинок на основі лазерної абляції» у ФРН на базі Ганноверського лазерного центру при університеті імені Готфріда Вільгельма Лейбніца.

Практичне значення одержаних результатів. Розроблений пристрій для вимірювання електропровідності мольозива використовується при виконанні госпдоговірної теми № 26-19 «Дослідження дозової залежності дії компонентів мольозива на тест-об'єкти та характеристику редокс-системи організму» в НДІ біології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна.

Розроблена методика має практичне застосування як експрес-метод контролю концентрації та фізико-хімічних характеристик наночастинок в суспензії при їх отриманні методом лазерної абляції за значенням електропровідності, а також як експрес-метод оцінки проліферативної активності клітин кісткового мозку в культурі *in vitro*.

Результати роботи впроваджено в освітній процес в рамках дисципліни «Біотехнологічна фармакологія» для студентів кафедри молекулярної біології і біотехнології біологічного факультету Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Результати дисертаційної роботи впроваджено в навчальний процес на факультеті радіофізики, біомедичної електроніки та комп'ютерних систем Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна при розробці

практичних робіт з дисципліни «Медико-біологічні дослідження» для студентів спеціальності 153 «Мікро- та наносистемна техніка» на першому (бакалаврському) рівні освіти.

РОЗДІЛ 1

МЕХАНІЗМИ ФОРМУВАННЯ ЕЛЕКТРОПРОВІДНОСТІ БІОЛОГІЧНИХ СИСТЕМ ТА ВПЛИВ ОСНОВНИХ БІОФІЗИЧНИХ ТА ФІЗІОЛОГІЧНИХ ХАРАКТЕРИСТИК БІОЛОГІЧНИХ СИСТЕМ (літературний огляд)

1.1 Історія досліджень електропровідності біологічних об'єктів. Дослідження імпедансу тканин і його інтерпретація

Теорія електропровідності матеріалів має довгу історію. У 1960-70-х роках виник активний інтерес до електропровідності рідких середовищ, одним з яких є вода. Відомий ряд монографій і статей вітчизняних [23, 24] і зарубіжних [25, 26] вчених за вказаний період.

Відповідно до сучасних уявлень про рідкі середовища, в тому числі з діелектричними властивостями [27], їх електропровідність визначається наявністю домішкових носіїв електричного заряду, які оточуються молекулами рідини і можуть пересуватися, що і створює умови для підвищеної електропровідності в порівнянні з газами і твердими діелектриками, а також рідкими діелектриками без домішок. Основні процеси, що впливають на електропровідність, – це утворення іонів (внаслідок електролітичної дисоціації у випадку з рідинами) в динамічній рівновазі з їх рекомбінацією, рух іонів в зовнішньому електричному полі, а також приелектродні явища. По-перше, електронні переходи на кордоні електрод-середовище забезпечують безперервність струму, а по-друге, взаємодія іонів і полярних молекул з електродами призводить до утворення подвійних електричних шарів. Вивчення подвійних електричних шарів при електродах важливо для побудови моделі вимірювання електропровідності, чим, зокрема, обґрунтовується переважний вибір змінного струму, що є важливим при розробці методів досліджень.

Провідні рідини включають в себе клас іонних рідин [28-30], таких як імідазол. В рамках дослідження електропровідності біологічних рідин дослідження іонних рідин важливе з точки зору розуміння загальних механізмів електропровідності, оскільки біологічні рідини не є іонними рідинами, але на їх основі можна розробляти моделі для вивчення фізичних процесів, які супроводжують протікання струму. Принципова відмінність іонних рідин від розчинів електролітів в рідких діелектриках полягає в тому, що в розчинах електролітів іони взаємодіють в першу чергу з молекулами розчинника, в той час як в іонних рідинах іони складають основу речовини і взаємодіють один з одним. В роботі [28] досліджено температурну залежність електропровідності імідазолу як іонної рідини. Показано збільшення питомої електропровідності зі зростанням температури.

Інформативною моделлю для досліджень є розчин імідазолу в воді. Згідно з результатами публікації [30], додавання імідазолу в воду викликає значне збільшення електропровідності води. В роботі [29] показано, як на питому електропровідність впливає утворення міцел імідазолу у водних розчинах. Показано, що питома електропровідність розчину збільшується прямо пропорційно до концентрації імідазолу до певної межі (Рис. 1.1), після якої спостерігається перелом графіка, і подальше збільшення концентрації менше впливає на електропровідність. Автори роблять висновок, що це відбувається через утворення міцел. Даний тип рідини може служити наближеною моделлю біологічних рідин для дослідження фактору утворення комплексів. Аналогія можлива, оскільки біологічні рідини в своєму комплексному складі містять, серед іншого, високомолекулярні сполуки [31] з різною здатністю до утворення іонів і різним характером взаємодії з водою (гідрофільність, гідрофобність).

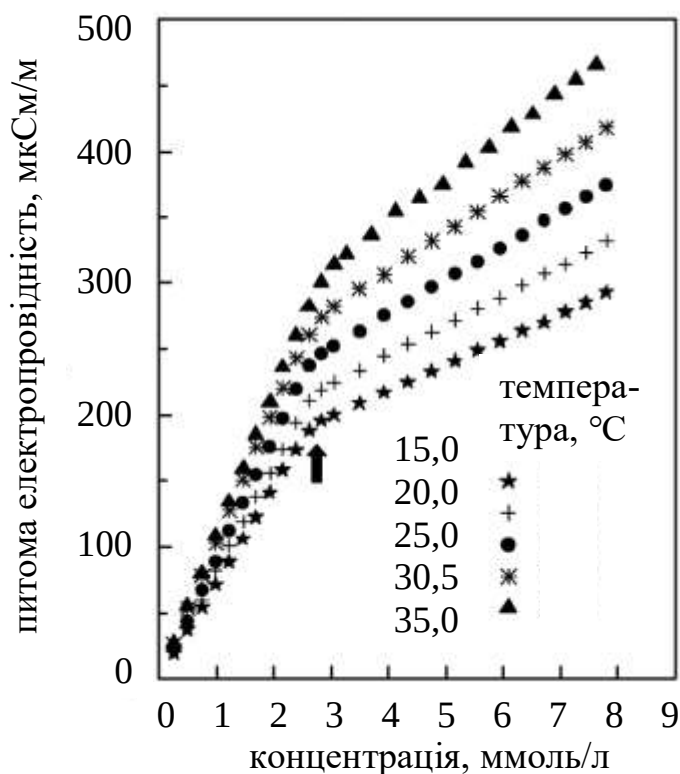


Рис. 1.1 Залежність питомої електропровідності від концентрації імідазолу $C_{14}mimBr$ при різних температурах. Температури вказані на рисунку [29].

Ще в 1986 році [32] було проведено комп'ютерну симуляцію молекулярної динаміки водного розчину для іонів Na^+ і Cl^- і досліджено обмежуючий вплив динамічних процесів на електропровідність. Розраховано коефіцієнти дифузії іонів на основі теорії броунівського руху, що добре узгоджувалося з розрахунками на основі рухливості іонів.

В роботі [33] описано комплексоутворення (іонні пари, трійники, диполь-дипольні ланцюжки, іонно-дипольні кластери) в розчинах електrolітів, показано зв'язок між процесами комплексоутворення і іонною провідністю. В роботі досліджено ряд окремих випадків кінетики комплексоутворення (кінетика дисоціації іонних пар, швидкість рекомбінації двох іонів, швидкість рекомбінації іона і диполя, іонно-дипольні кластери і т.д.), і досліджені окремі випадки зводяться до спільного висновку, що обмеженість швидкостей протікання процесів комплексоутворення впливає на значення електропровідності.

Роботу [34] присвячено дослідженню складу ґрунту, і в одному з розділів [34, chapter 15] показано зв'язок електропровідності ґрунту з наявністю розчинних іонів. Авторами розглянуто характеристики іонного складу, специфічні для ґрунтознавства, і інтерес представляє сам принцип інтерпретації значень електропровідності для визначення іонного складу розчину, який до того ж складним чином розподілено в пористій структурі. Автори в роботі [35] показали зв'язок електропровідності ґрунту з вмістом в ній води, прийнявши іонний склад даного ґрунту постійним.

Технічне завдання вимірювання питомої електропровідності рідини в простому випадку зводиться до застосування закону Ома і зводиться до вимірювання сили струму через вимірювальну осередок при відомому подається напрузі [27], однак через різноманіття ефектів, які супроводжують протікання струму в рідинах різної складності складу і які частково описані вище, стоїть завдання інтерпретації отриманих результатів вимірювань. Тому модель вимагає ускладнення, обліку всіх факторів, які можуть впливати на вимірювання. Тому запропоновано велику кількість технічних рішень для вимірювання електропровідності рідин різного складу (авторами [36, 37] запропоновані способи модернізації методу кондуктометрії, авторами [38] розроблений автоматизований комплекс для вимірювання електричного імпедансу), і ці розробки тривають.

1.2 Біоімпедансний аналіз складу тіла людини

У другій половині XX століття в окремий напрям досліджень виділилося вивчення складу тіла людини [39], і з початку 1960-х років виникають перші ідеї використовувати вимірювання електричної провідності різних тканин тіла для визначення складу тіла людини [40]. У 1990-ті роки спостерігався найбільший прорив у розвитку даного напрямку [41], і на сьогоднішній день існує велика кількість технічних реалізацій методу.

Відповідно до моделі, що лежить в основі принципів біоімпедансного аналізу [42], імпеданс – це двовірний вектор, який може бути виражений через амплітуду

і фазовий кут або через активну і реактивну складові. Активна (резистивна) складова являє собою опір струму, що протікає через клітинну і позаклітинну рідини, а субстратом реактивного опору є клітинні мембрани, тому ця складова опору носить ємнісний характер.

Одним з основних завдань, що вирішуються при реалізації біоімпедансного аналізу, є підбір еквівалентної електричної моделі тіла людини. Оскільки тіло людини є структурно складним з точки зору електричних параметрів, можлива велика кількість моделей, які з різним ступенем точності описують протікання електричного струму [39]. Тіло містить багаточисельні структури (шкіра, жирова, м'язова і кісткова тканини, кровоносні судини), кожна тканина є складною клітинною структурою, в якій струми протікають як по позаклітинній рідині, так і всередині клітин, причому з різними механізмами протікання струму (резистивний і ємнісний). Відомо також [43], що електричний імпеданс проявляє нелінійну природу.

Таким чином електричну модель тіла людини можна представити в загальному випадку як різні комбінації паралельних і послідовних з'єднань резисторів і конденсаторів. Наприклад, використовуються двох-, трьох- і багатокомпонентні моделі складу тіла, кожна з яких вимагає своєї технічної реалізації та математичної інтерпретації.

Біоімпедансний аналіз дозволяє, крім складу тіла, досліджувати пошкодження біологічної тканини, в роботі [44] представлені результати математичного моделювання електричних параметрів пошкодженої тканини. Показано, що через порушення цілісності клітинних мембран, які можна уявити як конденсатори, зменшується ємнісна складова імпедансу і збільшується резистивна.

В роботі [39] запропоновано вдосконалену 8-електродну систему вимірювання, яка в експериментальних дослідженнях дозволила отримати високу точність визначення м'язової маси тіла і процентного вмісту жирової тканини.

На даний момент метод біоімпедансного аналізу, будучи добре дослідженим методом, зайняв свою нішу в біомедичних дослідженнях, і подальші дослідження спрямовані на вдосконалення різних варіантів технічної реалізації.

1.3 Фактори, що впливають на характеристики електропровідності в біологічних рідинах (молозиво, культуральне середовище, культура клітин)

У моделі електродинаміки електропровідність речовини можна звести до двох основних факторів: кількості вільних носіїв заряду і їх рухливості. Біологічні рідини являють собою складні багатокомпонентні системи, в яких кількість і рухливість вільних носіїв заряду опосередковано визначаються взаємодією безлічі біологічних, біохімічних і біофізичних показників. Побудова математичної моделі, яка б враховувала всі параметри, що прямо або опосередковано впливають на електропровідність біологічних рідин, є складним завданням.

На практиці електропровідність можна розглядати як інтегральний показник (наприклад, електропровідність використовують як інтегральний показник визначення якості м'ясної продукції [45], якості агар-агара для застосування в якості поживного середовища для посівного матеріалу при діагностиці туберкульозу [46]), або використовується залежність електропровідності від одного досліджуваного параметра за умови, що інші параметри, потенційно здатні вплинути на електропровідність, залишаються незмінними. Дослідження з вивчення впливу окремих параметрів на інтегральний показник можуть служити експериментальною основою для удосконалення теоретичної моделі формування електродинамічного показника.

Відомі роботи з дослідження впливу вологості середовища на його електрофізичні параметри. В роботі [47] змодельовано процес вимірювання вологості в зерновій масі діелькометричним кондуктометричним методом. Матеріали, що містять вологу, яким в рамках використаній в роботі моделі є зерно, будучи в сухому вигляді діелектриками, в результаті зволоження проявляють властивості напівпровідників, тому питомий опір середовища на постійному струмі може бути використано як показник вологості. Однак неоднорідність діелектрика вносить суттєву помилку в вимірювання, тому більшу точність забезпечує вимірювання вологості з використанням змінного струму. При протіканні змінного

струму в значення електропровідності вносить вклад ємнісна складова, що дозволяє оцінити діелектричну проникність середовища.

Однією з досліджуваних біологічних рідин є молоко. Зокрема, широко досліджуються властивості коров'ячого молока. Воно являє собою полідисперсну систему води з жирами, білками, молочним цукром, мінеральними солями і незначними кількостями інших речовин [48]. Електропровідність молока зумовлено наявністю в молоці вільних іонів і електрично заряджених частинок [49, 50]. Компоненти молока мають різні електричні заряди: молочний цукор електронейтральний, іони різних солей мають позитивні або негативні заряди, білки – здебільшого негативні, жирові краплі мають як власний заряд, так і переносять заряд білків, якими вони оточені [51, 52]. Електропровідність молока залежить від періоду лактації і від наявності захворювань корови, таких як мастит або туберкульоз.

В роботі [53] досліджено вплив наявності соматичних клітин в овечому молоці на його електропровідність. Граничною кількістю соматичних клітин в молоці, вище якої вівця вважається хворою на мастит, може бути прийнято за різними джерелами від 250 тис/см³ до 1 млн/см³, ці значення формують вимоги до чутливості методу. Дослідження показали, що зі збільшенням кількості соматичних клітин електропровідність збільшувалася, одночасно зі зменшенням вмісту білка і лактози. Тієї ж групою авторів проведені аналогічні дослідження козячого молока [54].

Аналогічна методика застосовувалася в роботі [55] з ранньої діагностики маститу у корів. Автори отримали достовірні відмінності електропровідності проб молока при вмісті клітин від 500 тис/см³. Авторами технічно реалізовано вимірювальний блок, вбудований в доїльний апарат, що дає можливість виділяти аномальне молоко в потоці при обслуговуванні великого поголів'я тварин. В роботі вітчизняних вчених [56], присвяченій аспектам роботизації молочних ферм, також передбачено блок вимірювання електропровідності молока з метою визначення підозри на мастит.

Серед загальноприйнятих у ветеринарній практиці методів мамологічної діагностики корів [57], овець і кіз [58] відводиться місце мілк-сканерів. Вони застосовуються для виявлення субклінічного маститу, оскільки при цій формі неможливо клінічно констатувати порушення в молочній залозі, однак зміни характеристик молока, зокрема, електропровідності, можуть бути зареєстровані.

Досліджено залежність біохімічних і електрофізичних показників овечого молока від періоду лактації [59]. Автори роблять акцент на дослідженні поступового зниження жирності і вмісту імуноглобулінів з першого дня лактації, при цьому електропровідність вимірюється в якості інтегрального показника. Електропровідність з першого дня лактації протягом досліджуваного періоду (4 дні) збільшувалася кожен день на від 55,8% до 80,6%. Теоретичного обґрунтування такої зміни електропровідності і його зв'язку з біохімічним складом молока автори не наводять.

У зарубіжній літературі також відомі роботи [60-62] з дослідження можливостей діагностики маститу, зокрема на субклінічних стадіях, за зміною електропровідності молока. Такі дослідження ведуться з 1990-х років. В роботі [60] електропровідність молока використовується в комплексі з температурою молока і кількістю надойв в автоматизованій системі вимірювання. Роботу [61] присвячено перевірці методу в умовах скринінг-діагностики на 549 пробах молока 322 корів і визначенню статистичної достовірності методу. Результати роботи підтверджують зв'язок між збільшенням електропровідності молока і наявністю маститу у корови. Електропровідність використовується як самостійний параметр без прив'язки до температури молока.

Автори роботи [63] застосували статистичні методи виявлення кореляції між показниками електропровідності, кількості соматичних клітин у молоці і наявністю маститу. Результати показали, що кореляція є, але, за свідченням авторів, недостатня для використання електропровідності як самостійного достовірного діагностичного показника.

В роботі [62] авторами досліджено залежність кількості соматичних клітин та електропровідності молока від стадії захворювання на мастит. На відміну від [53],

в роботі [62] не поставлено мету дослідити залежність електропровідності від кількості соматичних клітин, автори використовують електропровідність як додатковий параметр і приходять до висновку, що величина електропровідності менш чутлива до наявності патології, ніж кількість соматичних клітин. Проте вимірювання електропровідності набагато краще піддається автоматизації, тому дослідження [53] з інтерпретації електропровідності як індикатора зміни кількості соматичних клітин є актуальними.

Більш сучасні дослідження зарубіжних авторів [64, 65] спрямовано на застосування обчислювальних алгоритмів в діагностиці маститу, зокрема нечіткої логіки. Такі алгоритми використовуються при відсутності теоретичної моделі біологічної інтерпретації фізичного параметра і особливо ефективні для виявлення і використання емпіричних залежностей.

В роботі [66] досліджено зміни електропровідності молока в комплексі з активністю корови і кількістю надоїв при субклінічних формах кетозу і ацидозу. В обох випадках спостерігалось збільшення електропровідності молока, за 2 доби і за 6-7 діб у разі ацидозу до появи клінічних симптомів захворювання.

Залежність провідності від іонного складу біологічних рідин знайшла застосування в роботі [67] з виявлення фальсифікації молока содою. Сода може додаватися в молоко як речовина лужного характеру для зменшення кислотності молока, що прокисло в процесі зберігання. Експериментальні дослідження показали триразове збільшення електропровідності молока в порівнянні з контрольним зразком при додаванні 3 г соди на 100 г молока, і помітно зміну при додаванні від 0,3 г. В роботі показано перевагу кондуктометричного методу в порівнянні з поширеним титрометричним, що вимагає хімічних реагентів і умов лабораторії.

Ряд робіт засновано на залежності електропровідності культурального середовища клітин від його іонного складу, який автори робіт зв'язали з показниками життєдіяльності клітин.

В роботі [68] авторами запропоновано метод визначення сумарної ферментативної активності дріжджів за зміненням електропровідності

культурального середовища дріжджових клітин. В роботі вимірювання електропровідності здійснювалося на частоті 20 кГц, що дозволяє судити здебільшого про електропровідність культурального середовища і не враховувати реактивну складову, обумовлену ліпідними мембранами клітин [69]. Використовувалася модель, відповідно до якої електропровідність визначається наявністю хімічно активних речовин, які утворюються в ході ферментативного розщеплення внесеного в середовище субстрату в клітинах дріжджів. Акцент зроблено на швидкість змінення електропровідності і її зв'язку з ферментативною активністю.

У роботах [70, 71] також з прикладною метою використовується виявлений зв'язок електропровідності культурального середовища з наявністю певних метаболітів грибів. У даних роботах це використовується для виявлення цвілі та інших мікроорганізмів в харчових продуктах і сировині. Метод не має специфічності, оскільки до збільшення електропровідності призводить не тільки наявність метаболітів конкретних організмів, але в моделі методу розглянутий випадок вважається типовим і за замовчуванням поширеним.

Авторами [72] електропровідність використовується як показник бактеріального розкладання органічної речовини в ставковій воді, що досліджувалась, до мінеральних сполук, що знаходяться у воді в іонній формі.

Існує гіпотеза про вплив реструктуризації води на електропровідність культурального середовища. В роботі [73] описано дослідження зазначеного впливу. Дослідження ускладнюється тим, що на електропровідність суспензії клітин (в даній роботі використовувалися клітини різних штамів бактерій) крім реструктуризації води впливають інші чинники, зокрема іонний склад культурального середовища, оскільки біологічна система є динамічною і звести вплив динаміки інших параметрів до нуля не можна. Вплив реструктуризації води на електропровідність пояснюється зміною рухливості іонів.

Автори роботи [74] досліджували властивості координаційних сполук цинку і кадмію з гідразидом бензенової кислоти. У роботі докладно описаний процес синтезу сполук, що досліджувалися, валентні коливання груп атомів, квантово-

хімічні розрахунки і відтворена структура молекули. Електропровідність була використана в роботі як показник вмісту іонів в розчині. Для ідентифікації цих іонів були використані додаткові хімічні методи аналізу: якісні реакції на передбачувані іони.

Окрім вимірювання електропровідності, представляє інтерес дослідження масопереносу, що супроводжує процес протікання електричного струму в рідинах. Розуміння даного процесу дозволяє краще зрозуміти механізми електропровідності, і також може мати окреме прикладне значення. В роботі [75] теоретично описано поведінку заряджених і поляризованих частинок в неоднорідному електричному полі. На базі описаної теорії розроблено метод очищення стічних вод дріжджових і хлібопекарських підприємств від колоїдних частинок різної природи, мікроорганізмів, фарбувальних і інших органічних речовин.

1.4 Взаємозв'язок температури з електропровідністю біологічних систем

Відомо [76, 77], що електропровідність рідин, в тому числі біологічних, залежить від температури. Проте, найчастіше ця інформація використовується для обґрунтування вибору умов експериментів. Автори досліджень, знаючи про наявність температурної залежності електропровідності, оговорюють в своїх роботах, що вимірювання проводяться при фіксованій температурі. Сама ж залежність електропровідності біологічних рідин від температури і механізми її прояви вивчені недостатньо і зустрічаються в вузькоспеціалізованих прикладних дослідженнях. Наприклад, в роботі [78] показано зростання електропровідності при омичному нагріванні в діапазоні температур 25 °C – 140 °C різних фруктів (яблук, слив, ананасів і т.д.) і різних видів м'яса в залежності від вмісту вологи та жиру. У всіх перерахованих випадках електропровідність при нагріванні зростає, графіки залежностей представлені на Рис. 1.2.

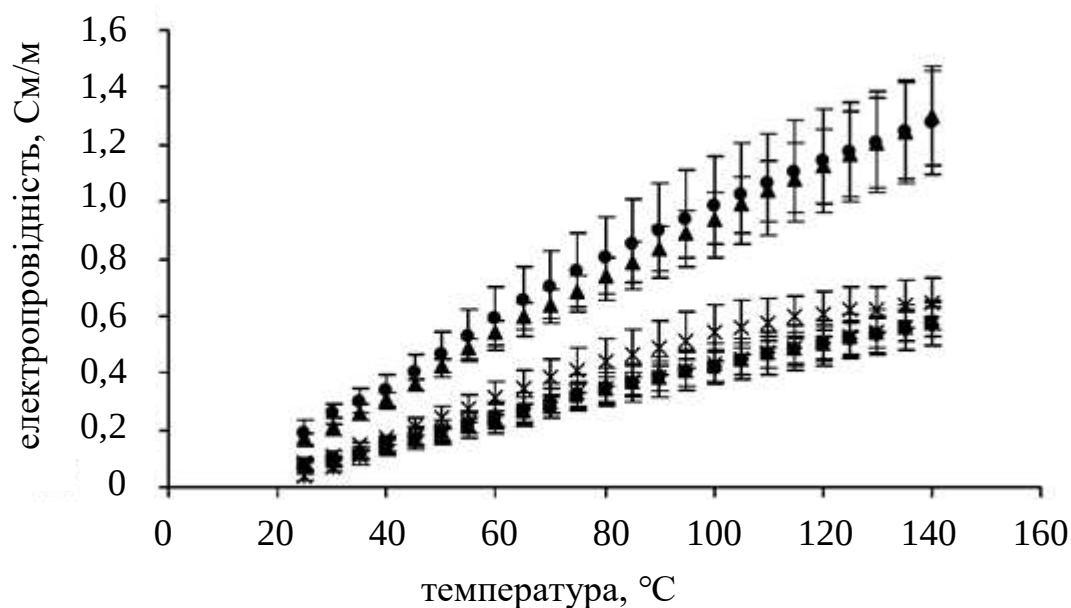


Рис. 1.2 Температурна залежність електропровідності фруктів, ♦ – жовте яблуко, ■ – червоне яблуко, ▲ – персик, × – груша, ✱ – ананас, ● – полуниця [78].

В роботі [79] представлено математичну модель і теоретичні розрахунки змінення електропровідності біологічної тканини під час радіочастотної абляції. Абляція представляє собою руйнування тканини, що відображається на різкому падінні електропровідності після її поступового наростання, що може бути використано для контролю зазначених процесів.

В роботі [80] показана залежність електропровідності шкіри під час контралатерального холодного тесту. Цей тест є методом дослідження мікрогемодинаміки. Електропровідність також збільшувалася при збільшенні температури.

1.5 Наночастинки і їх вплив на електропровідність біологічних систем

В даний час досягнуто певного прогресу у вивченні теплових властивостей наночастинок, їх ролі в перенесенні тепла на мікрорівні. Магнітні властивості наночастинок використовуються для їх нагрівання при впливі на них змінного магнітного поля або електромагнітного випромінювання. Цей ефект знайшов

застосування, зокрема, для гіпертермії злоякісних утворень [81] і для розігріву кріоконсервованих тканин [82].

Вплив зміни температури тканини в процесі терапевтичної гіпертермії на електропровідність тканини вивчається, цього ефекту присвячена робота [83]. Гіпертермія проводилася за допомогою низькочастотного електромагнітного випромінювання без використання наночасток, з цієї точки зору інтерес представляють температурні ефекти, що впливають на електропровідність біологічної тканини.

Окрім теплових ефектів, сама наявність наночастинок в біологічній системі може впливати на її електропровідність. В роботі [84] описаний колоїдно-біохімічний механізм взаємодії клітини з мікро- і наночастинами. В роботі показано вплив наночастинок на іонний склад середовища, на клітинний метаболізм і на роботу іонних насосів, що може впливати на електропровідність біологічної системи. Залежність електропровідності біологічних систем від наявності наночастинок і їх характеристик вивчена недостатньо.

З точки зору впливу наночастинок на електропровідність середовища становить інтерес робота [85], в якій досліджуються нові водні форми левоміцетину. В роботі досліджено утворення функціональних олігоелектролітів і їх біологічні властивості. З точки зору електродинаміки розглядаються колоїдні системи частинок нанорозміру з гідрофобним ядром, в якому можуть розчинятися водонерозчинні фармацевтичні речовини. Електропровідність таких систем не була основним предметом дослідження в даній роботі, однак вимірювалася в якості додаткового показника стану системи. Електропровідність олігоелектролітного комплексу не є сумою електропровідностей вихідних компонентів, що могло б свідчити про утворення суміші, а дорівнює проміжному значенню між найбільшою і найменшою електропровідністю вихідних компонентів. Це підтверджує утворення комплексу. Результати даного дослідження показують можливість використання методу кондуктометрії для дослідження взаємодії наночастинок різних матеріалів з біологічними системами.

1.6 Взаємозв'язок електропровідності біологічних систем з функціональною активністю

Оскільки електропровідність рідини визначається її іонним складом, а у випадку культури клітин іонний склад культурального середовища змінюється в результаті метаболізму клітин, електропровідність суспензії клітин може бути пов'язана з параметрами метаболізму клітин і їх функціональної активності. У роботах [86, 87] проведено дослідження зміни електропровідності в процесі росту культури *E. Coli* в рідкому поживному середовищі. Графік залежності електропровідності від часу (Рис. 1.3) зіставлений з кривою зростання культури в замкнутій системі (без відводу метаболітів і додавання поживних речовин), на якій визначено вплив на електропровідність як збільшення кількості клітин, так і зміни складу середовища в процесі метаболізму при постійній кількості клітин, а також відмирання клітин. Показано ефективність використання імпедансометрії при дослідженні фармацевтичних сполук на процеси росту мікроорганізмів.

В якості інтегрального показника зростання культури *S. vetulus* електропровідність культурального середовища використовувалася в роботі [88]. Порівнювалася стабільність показників електропровідності при культивуванні з використанням дріжджів *S. cerevisiae* і *R. glutinis* без докладної інтерпретації даних показників.

Велика кількість робіт зарубіжних авторів [89, 90] присвячено дослідженню проліферативної активності культур клітин, є спроби дослідження зміни електропровідності в процесі проліферації і диференціації. На даному етапі можна стверджувати про наявність такого зв'язку, але механізми впливу не визначені.

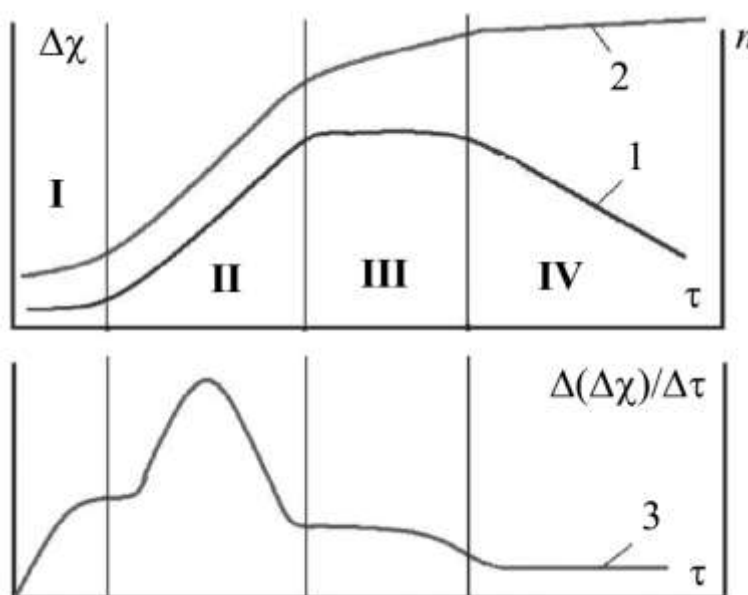


Рис. 1.3 Зіставлення типових «кривих зростання», що реєструються для чистої культури мікроорганізмів в замкнутій системі (без додавання поживних речовин і відведення метаболітів після початку вимірювань): безпосередньо за зміною концентрації мікробних тіл (n , КОЕ / мл) (1); опосередковано, за зміною питомої електропровідності середовища ($\Delta\chi$, мкСм / мл) (2), по осі абсцис – час від початку вимірювань (τ , год); (3) – зміна з часом величини $\Delta(\Delta\chi)/\Delta\tau$, мкСм / (мл · хв) (перша похідна кривої 2). Цифрами на малюнку позначені області фаз росту: I – початкової, II – експоненційної, III – стаціонарної і IV – відмирання. [87]

На тканинному рівні в роботі [91] показана ефективність електроімпедансної маммографії. Метод заснований на явищі підвищення електропровідності в областях з підвищеною проліферативною активністю. Підвищення електропровідності автори пов'язують зі збільшеним кровонаповненням і патологічним ангиогенезом, області яких на електроімпедансних томограмах реєструються як гіпоімпедансні осередки. Ефективність методу показана в ході досліджень груп пацієнток з вузловою мастопатією, що супроводжується наявністю гіпоімпедансних осередків, і з дифузною мастопатією, при якій гіпоімпедансні осередки зустрічалися статистично достовірно рідше. В даному підході абсолютні значення електропровідності неінформативні, про що свідчить вимірювання авторами електропровідності в умовних одиницях. Грає роль лише відносна зміна

електропровідності в області патології щодо здорових тканин, що оточують область патології.

Запатентовано [92] спосіб оцінки міцності післяопераційного рубця по його електропровідності. Електропровідність рубця як інтегральний показник визначається цілою низкою чинників: проліферацією сполучної тканини, процесами мікроциркуляції, метаболічних реакцій, які корелюються з механічною міцністю зрощення країв рани.

В роботах зарубіжних авторів показано перспективність напрямку імпедансної цитометрії одиночної клітини для біомедичних застосувань [93].

1.7 Взаємозв'язок біологічної активності клітин з іонним складом

У регуляції процесів життєдіяльності клітини важливе місце займають іони як носії заряду, продукти хімічних реакцій і регулятори інтенсивності їх протікання. В роботі [94] авторами проведений огляд робіт, що описують процеси формування інфламасом – мультимірних комплексів, що відповідають за запальні реакції в організмі, пов'язані з активацією клітин і секрецією цитокінів. У роботі зазначено, що механізми, пов'язані, в першу чергу, з рівнем іонів калію і кальцію, відносяться до основних внутрішньоклітинних регуляторів активності інфламасом. Активація деяких типів інфламасом залежить від низької концентрації калію всередині клітини і високою – поза клітиною. Також на активацію інфламасом впливає осмотичний тиск. У клітинах зі зниженою концентрацією калію і хлору виникає дегідратація, у відповідь на яку відбувається мобілізація іонів кальцію, що запускає ряд реакцій. Крім того, описано взаємозв'язок зазначених процесів зі вмістом активних форм кисню в цитоплазмі клітини. Перераховані параметри іонного складу, беручи участь в механізмах формування інфламасом, в той же час вносять вклад в електропровідність біологічної тканини. На електропровідність впливає як сама наявність іонів в якості вільних носіїв заряду, так і розподіл іонів поза клітиною і в цитоплазмі клітини.

Робота [95] присвячена впливу протонних (2-гідроксіетил)-амонієвих іонних рідин на бродильну активність спиртових дріжджів. Автори виявили достовірну стимулюючу дію іонних рідин, однак не пояснили механізм цієї дії.

Впливу іонів міді та нікелю на ціанобактерії і ціанобактеріальні асоціації присвячена дисертація [96]. Порушено в першу чергу питання забруднення ґрунту і його впливу на ґрунтові ціанобактерії як фактору зовнішнього впливу, приділяючи меншу увагу розгляду іонного складу клітин як показника функціональної активності клітин. Однак вивчення механізмів зовнішнього впливу дозволяє більш детально простежити роль іонів, в тому числі міді і нікелю, в процесах життєдіяльності клітини.

Аналогічне дослідження представлено в роботі [97], авторами вивчено вплив іонів марганцю на казеїнолітичну активність мікроводорості *Scenedesmus Ecornis*. Результати експериментів показали, що іони Mn^{+} викликають пригнічення реакцій внутрішньоклітинного протеолізу.

В огляді [98] детально описана роль іонного складу в функціональній активності мітохондрій, зокрема, генерації ними активних форм кисню. Розглядається роль іонів металів змінної валентності як каталізаторів відновлення кисню до супероксид-радикала. Розглянуто механізми утворення перекису водню в мітохондріях, виділених з різних тканин, і вплив на них іонного складу (зокрема, стимуляція протікання реакції іонами Ca^{+}) і рН середовища. Серед побічних продуктів реакції утворення перекису водню в мітохондріях представлено іони амонію, небезпечні для клітини. Автори приходять до висновку, що поживність отримання надійної кількісної інформації про швидкості утворення, розпаду і стаціонарні концентрації активних форм кисню сильно обмежена відсутністю простих методів їх вимірювання. Крім важливості розвитку аналітичної біохімії, перспективним може стати метод оцінки складу і стану клітин в середовищі за допомогою інтегрального показника, такого як електропровідність.

Висновки до розділу 1

Таким чином, методи вимірювання електрофізичних параметрів біологічних систем на різних рівнях ієрархії набули широкого застосування. Біофізичні процеси супроводжуються рухом, перерозподілом зарядів, зміненням іонного складу, зміненням рухливості вільних носіїв заряду, що має відображення на електрофізичних параметрах. Це вказує на принципову можливість інтерпретації результатів вимірювання як індикаторів біофізичних та фізіологічних процесів. Однак їх зв'язок є складним та недостатньо вивченим для однозначної інтерпретації. Тому в більшості прикладних застосувань автори показують принципову можливість такої інтерпретації та зводять задачу в рамках простої моделі до дослідження зв'язку електропровідності з одним обраним параметром, який має певний прикладний інтерес, вважаючи решту параметрів фіксованими.

Спроби використання електропровідності як інтегрального показника стану біофізичної системи є на початковому рівні досліджень та є перспективними.

Результати досліджень цього розділу наведено в таких публікаціях [13-22].

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

2.1 Характеристика об'єкта дослідження

Для оцінки деяких фізико-хімічних характеристик клітин кісткового мозку визначали вміст іонів міді (есенціального мікроелемента, який входить до складу більше 30 ферментів), іонів кальцію та реактивних форм кисню (ROS), а також електропровідності суспензії клітин кісткового мозку, виділених у молодих і старих тварин, як інтегрального показника заряджених і рухомих в електричному полі іонів і малих молекул в клітині.

Для оцінки адаптивної відповіді на рівні клітин кісткового мозку у молодих і старих тварин з метою зміни мікрооточення тваринам вводили сірчанокислу мідь в дозі 1 мг / 100 г маси тіла тричі з інтервалом 48 годин. Така інтоксикація організму супроводжувалася індукцією фіброзу печінки [99]. Після чого у цих тварин визначали вміст іонів міді, кальцію, ROS в суспензії клітин кісткового мозку, а також і електропровідність суспензії клітин кісткового мозку молодих і старих тварин. Такий підхід дозволяє оцінити вплив вихідного структурно-функціонального стану клітин, який може бути різним у молодих і старих тварин, на наступну адаптивну відповідь, і вплив різного мікрооточення клітин кісткового мозку на їх фізико-хімічні та функціональні характеристики (проліферативна активність в первинній культурі) (Рис. 2.1).

З метою визначення можливого взаємозв'язку між показниками фізико-хімічних рівнів клітинної організації і метаболічним рівнем, визначали кореляцію між вмістом іонів міді, кальцію, ROS і проліферативною активністю клітин кісткового мозку. При цьому виходили з того, що проліферативна активність є інтегральною характеристикою метаболічної спрямованості клітини (Рис. 2.1).

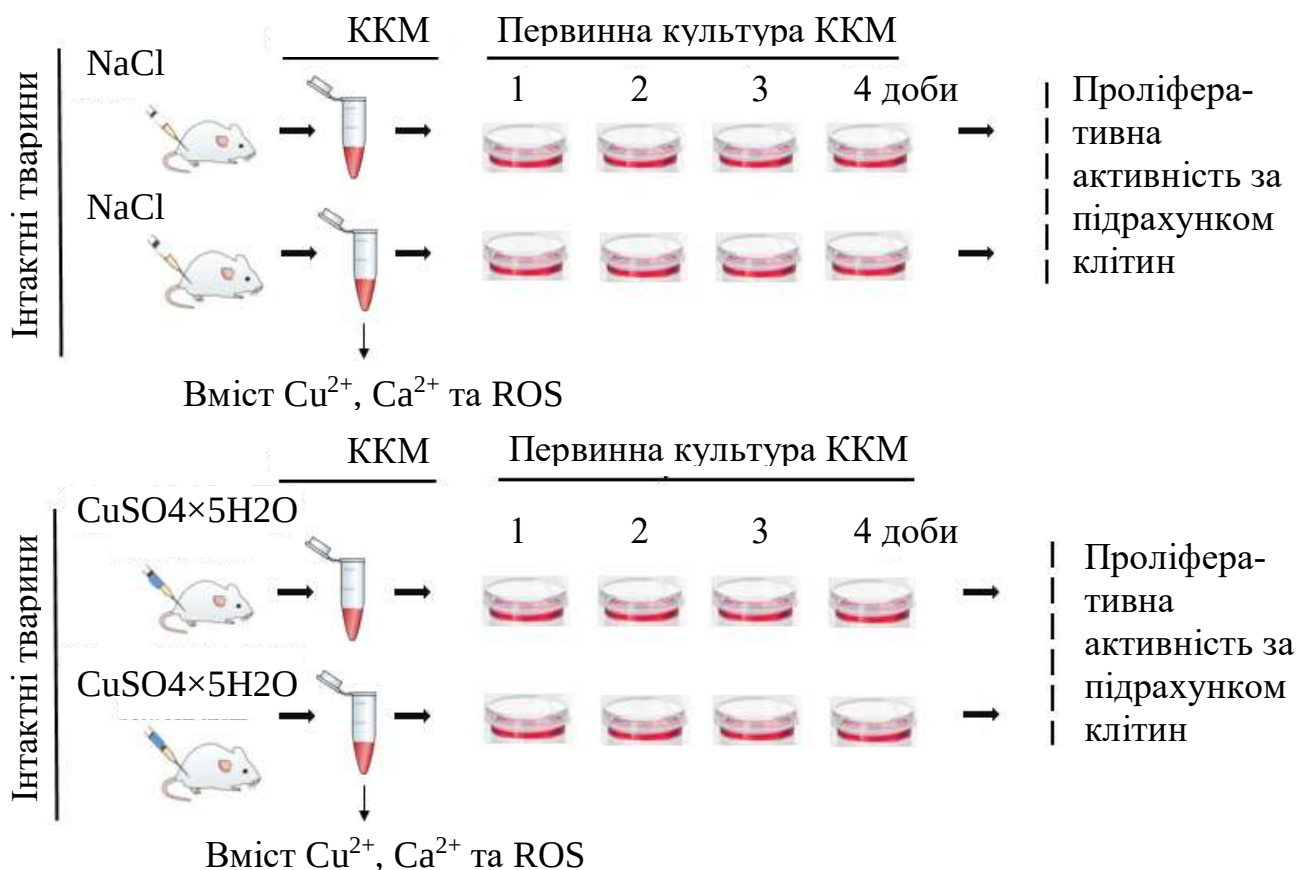


Рис. 2.1 Експериментальна схема, що демонструє виділення кісткового мозку у інтактних тварин і тварин після інтоксикації сірчаною міддю (3 рази з інтервалом 48 год). У клітинах кісткового мозку після виділення визначали вміст кальцію, міді, ROS і питомої електропровідності, а аліквоту клітин кісткового мозку культивували в системі *in vitro* протягом 4 діб з подальшим визначенням динаміки зростання культури і кількості збережених клітин кісткового мозку («тривалість життя» в первинній культурі).

Молозиво отримували в Фермерському господарстві «Альфа» (Україна) у корів породи українська молочно-ряба, другого удою після отелення. Знежирення проводили центрифугуванням молозива про 3000 g протягом 20 хвилин при кімнатній температурі. Після видалення жирів зі знежиреного молозива видаляли всі білки з молекулярною масою понад 10 000 Да шляхом мембранної фільтрації. Після цього зразки висушували на ротаційному апараті. Отримані зразки низькомолекулярних білків розчиняли у фізіологічному розчині і вводили їх експериментальним тваринам *per os* в дозі 0,1 мг / 100 г маси тіла. Через 24 години

тварин використовували для проведення експерименту. Отримували сироватку крові і в ній визначали вміст гідропероксидів ліпідів (ГПЛ) за методом [11] і активність глутатіонпероксидази (ГП) за методом [12]. Склад низькомолекулярних білків визначали на мас-спектрометрі Autoflex II LRF 20 «Bruker Daltonics» (Німеччина), оснащеному імпульсним азотним лазером ($\lambda = 337$ нм, тривалість імпульсу 3 нс). Отримані результати піддавали статистичній обробці методом тесту Манна–Уїтні з використанням програмного забезпечення Statistica 8.0 (StatSoft Inc., USA). Відмінності між контрольними і експериментальними групами приймалися достовірними при $p < 0,05$ у порівнянні з контрольним.

2.1.1 Експериментальна схема підготовки тварин до дослідження

Експерименти проводили на статевозрілих 3-х місячних і 20-ти місячних самцях щурів лінії *Wistar*. Всі процедури з тваринами виконувалися з дотриманням біоетичних правил [9] і з урахуванням циркадних ритмів формування біологічних відповідей. Для цього тварини завжди отримували в один і той же час доби їжу, містилися в стандартних умовах і всі маніпуляції (введення токсичних або інших препаратів) здійснювалися в один і той же час доби до прийому їжі. За 24 години до виділення клітин кісткового мозку тварини не отримували їжу. Виведення тварин з експерименту завжди здійснювали з 8 до 10 години ранку за місцевим часом.

У кожній віковій групі тварини були розділені на інтактну контрольну групу ($n = 6$) та на групу тварин з інтоксикацією, індукованою введенням сірчаної кислоти міді ($n = 6$). Всього в експериментах було використано 24 тварин.

Інтоксикацію індукували трикратним послідовним внутрішньочеревним введенням водного розчину різних доз сірчаної кислоти міді. Схему індукції обґрунтовано в роботі [100]. Тваринам інтактної групи вводили фізіологічний розчин по тій же схемі (Рис. 2.1). Зупинку експериментальних процедур здійснювали зануренням тварин в ефірний наркоз з подальшим виділенням у них клітин кісткового мозку.

2.1.2 Виділення і культивування клітин кісткового мозку *in vitro*

Клітини кісткового мозку виділяли з двох стегнових кісток щура за методом [101] і культивували в середовищі 199 з HEPES (4-(2-гідроксіетил)-1-піперазинетансульфоною кислотою) і антибіотиками (8% гентаміцину і 8% стрептоміцину) і 20% інактивованої фетальної телячої сироватки. Культивування в стандартних умовах проводили при 37 °C в атмосфері 5% CO₂. Кількість клітин і їх морфотипи визначали щодня з 1 по 4 добу культивування. Культуральне середовище при цьому не змінювали. Початкова концентрація клітин кісткового мозку при культивуванні завжди становила 2 млн. клітин / мл.

2.1.3 Визначення характеристик клітин кісткового мозку в культурі *in vitro*

2.1.3.1 Визначення кількості клітин і їх морфотипів

Підрахунок і оцінку життєздатності клітин кісткового мозку тварин проводили, як описано в роботі [102]. Визначення морфотипів клітин кісткового мозку проводили відразу після отримання суспензії клітин кісткового мозку, а також на другу і четверту добу культивування, як описано в роботі [103]. Цитологічні препарати фарбували за Романовським – Гімзе, аналізували їх при збільшенні x100 на мікроскопі ZeissPrimoStariLED (Німеччина).

2.1.3.2 Визначення кількості іонів кальцію і вільних форм кисню

До 50 мкл суспензії клітин (6×10^6 /мл) вносили 5 мкл робочого розчину для визначення вільних форм кисню, керуючись рекомендаціями фірми-виробника Cellular ROS Assay Kit - Red (ab186027) [104]. Для визначення кількості іонів кальцію в клітинах кісткового мозку вносили 5 мкл робочого розчину Fluo3 з концентрацією 25 мкМ. Змішували піпетуванням і інкубували 15 хвилин в темному

місці при кімнатній температурі. Візуалізацію клітин проводили методом конфокальної мікроскопії, використовуючи лазерний скануючий конфокальний мікроскоп Olympus FV10i-LIV (Olympus, Японія). Використовуючи інтегроване програмне забезпечення Olympus FV4.1, проводили вимірювання відносної інтенсивності флюоресценції в кожній окремій клітині, враховуючи фонове світіння. Деконволюцію зображення і тривимірну реконструкцію об'єкта проводили з використанням програмного забезпечення Olympus CellSense Dimension Desktop.

2.1.3.3 Визначення кількості іонів міді

Для визначення вмісту іонів міді до 500 мл проб клітин кісткового мозку додавали по 1 мл сірчаної і 1 мл азотної кислот, після чого нагрівали при температурі 140 °C протягом 60 хвилин. Вміст іонів міді визначали на атомно-адсорбційному спектрофотометрі С-115-М1 (Україна).

2.1.4 Визначення характеристик цільного молозива, знежиреного молозива і низькомолекулярних компонентів

Зразки молозива отримували в фермерському господарстві «Альфа» Харківської області (Україна) у трьох корів породи українська молочно-ряба, які мали імена «Аврора», «Бариня» і «Муха». Зразки молозива містилися в однакових умовах, для досліджень відбирали молозиво другого удою. З цільного молозива готували знежирене молозиво. Для цього цільне молозиво центрифугували при 3000 g протягом 15 хвилин при кімнатній температурі. Ліпіди видаляли, і центрифугування повторювали ще один раз з подальшим видаленням залишкових ліпідів. Зі знежиреного молозива видаляли високомолекулярні білки (молекулярна маса більше 10 кДа) мембранної фільтрацією з діаметром пір ~ 10 мкм, і таким чином отримували так звану низькомолекулярну фракцію молозива.

2.1.4.1 Визначення вмісту і складу білків молозива

Вміст білків визначали за методом Lowry et. al. [105].

Для дослідження складу білків цільного молозива і НКМ готували зразки так, щоб в 1 мл містилося 2 мг білка кожної з фракцій. Мас-спектрометричні дослідження проводили на приладі Autoflex II LRF 20 «Bruker Daltonics» (Німеччина), оснащеному імпульсним азотним лазером ($\lambda = 337$ нм, тривалість імпульсу 3 нс). Зразки білків після змішування з матрицею, яку готували за стандартною процедурою: 12 мг синапової кислоти (Fluka) розчиняли в 1 мл суміші вода – ізопропаноловий спирт (1:2 V / V) з додаванням 0,1% трифтороцтової кислоти, наносили на сталеву мішень і сушили при кімнатній температурі. Аналіз проводили в лінійному режимі роботи приладу з детекцією позитивних і негативних іонів. Аналіз отриманих результатів проводили за допомогою відкритого програмного забезпечення ProteoWizard (<http://proteowizard.sourceforge.net>) mMass (<http://mmass.org>).

2.2 Експериментальна установка для отримання наночастинок методом лазерної абляції

Лазерна генерація наночастинок з термічної підтримкою здійснювалася у вакуумній камері. Плоску підкладку з нержавіючої сталі було поміщено в цю камеру і підключено до зовнішнього джерела сильного електричного струму (GEN1500W, HEIDEN power GmbH, Німеччина), щоб забезпечити нагрів матеріалу мішені при прямому контакті, як показано на Рис. 2.2 А.

Камера також мала вводи для вимірювання температури за допомогою термопари, датчик вимірювання тиску (VD83, Thyracont Vacuum Instruments GmbH, Німеччина), регульований впускний отвір для потоку газу і вікно введення лазерного променя з кварцового скла без покриття під кутом Брюстера. Лазер, використаний для цих експериментів (HD40I-E, EdgeWave GmbH, Німеччина),

генерував імпульси тривалістю 8 нс на довжині хвилі 1064 нм і, запускався ззовні з частотою в діапазоні від 93 Гц до 576 Гц в залежності від умов експерименту.

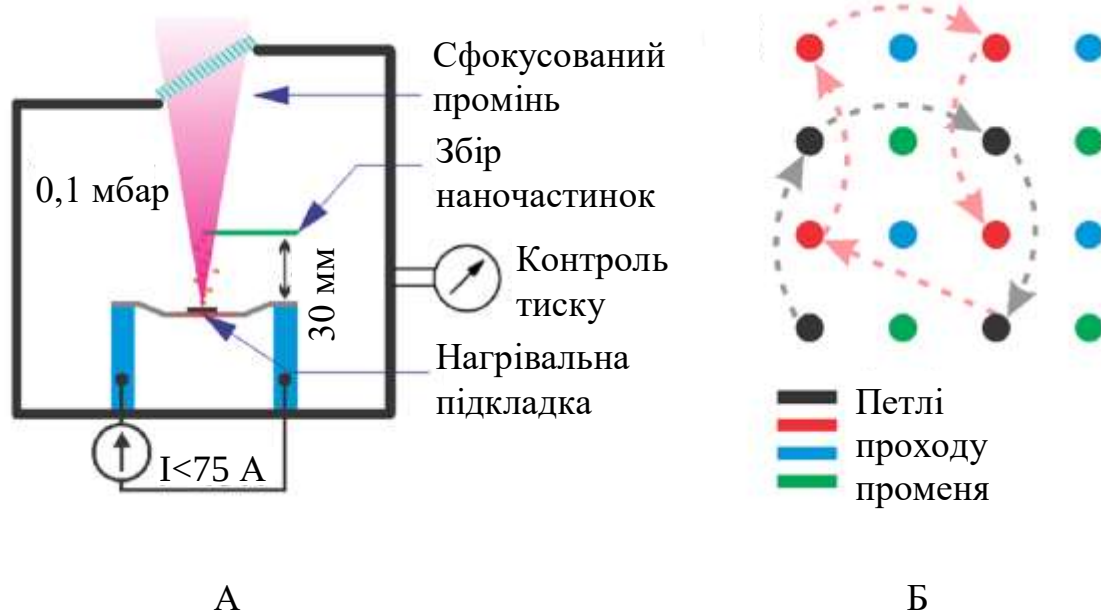


Рис. 2.2 Схематичне зображення вакуумної камери (А) і контуру схеми подачі лазерного імпульсу (Б).

Лазерний промінь просторово обмежений та направлений для отримання квадратного профілю (3×3 мм) і сфокусований на цілі за допомогою двоопуклої лінзи 400 мм, що дозволяє отримати розмір області розподілу енергії лазерного променя при одиничному імпульсі (точки опромінення) 225 мкм в діаметрі. Позиціонування точки опромінювання на поверхні мішені здійснювалося за допомогою гальванометричного сканеру (hurrySCAN II 14, SCANLAB GmbH, Німеччина). Щоб звести до мінімуму локалізоване індуковане лазером накопичення тепла на сусідніх точках опромінення, замість безперервної лінії абляції використовувалася непослідовну схему опромінення мішені з вкладеними петлями, як показано на Рис. 2.2 Б, для абляції всієї поверхні залізної мішені 6000×6000 мкм.

Відстань між послідовними лазерними імпульсами (одиначна петля) становить 1500 мкм, тоді як кінцева відстань (після повного циклу) між сусідніми точками становила 250 мкм, що призводило до рівномірного розподілу залишкової

теплової енергії лазера і масиву розподілених точок, в яких було проведено абляцію. Міжімпульсна затримка в точці (проміжок часу, який проходить після абляції в кожній точці до прибуття наступного імпульсу в тій же точці) контролювалася часовою затримкою між лазерними імпульсами. Енергія лазерного імпульсу, що падає на мішень, регулювалася за допомогою набору діелектричних дзеркал, а загальна експозиція лазерного випромінювання для кожного експерименту вимірювалася на каліброваному плечі світлодільника з використанням піроелектричного вимірювача енергії імпульсів (Nova II з PE25-C, Ophir Spiricon Europe GmbH, Німеччина). Швидкість утворення частинок оцінювалася за зміною маси мішені з використанням прецизійних вагів (R160, Sartorius AG, Німеччина).

Для характеристики наночастинок за допомогою сканувального електронного мікроскопа (SEM) або трансмісійного електронного мікроскопа (TEM) покривні скельця або покриті вуглецем мідні сітки, відповідно, містилися на відстані 30 мм паралельно поверхні мішені. Проводили рентгенівську дифрактометрію (XRD) оброблених залізних мішеней. Всі описані експерименти проводилися при постійному потоці атмосферного повітря при тиску 0,1 мбар. Зображення плазмових шлейфів були отримані за допомогою камери з механічним затвором і витримкою 2 мс, тоді як спектри були отримані за допомогою спектрометра (HR2000p, Ocean Optics, Inc., США).

2.3 Пристрої, сенсори та технічні рішення для вимірювання електропровідності твердих та рідких середовищ

2.3.1 Електромагнітний сенсор на мікросмушковому резонаторі для вимірювання діелектричної проникності матеріалів

Електропровідність і діелектрична проникність є основними показниками, що визначають поширення ЕМП (електромагнітного поля) в живій матерії. Діелектрична проникність визначає характер взаємодії ЕМП з біологічною

тканиною. Живі тканини, що складаються з клітин і позаклітинної рідини, містять іони і полярні молекули. Діелектричні властивості біологічної тканини визначаються двома основними процесами, які спричиняють зовнішні ЕМП. Першим процесом є колювання вільних зарядів, він призводить до збільшення струмів провідності і втрат енергії. Другим процесом є обертання дипольних молекул з частотою поля, що було прикладено ззовні. Цей процес визначає струми зміщення. Таким чином, відносна діелектрична проникність має комплексний вид:

$$\frac{\varepsilon^*}{\varepsilon_0} = (\varepsilon' - j\varepsilon''), \quad (2.1)$$

де ε^* – комплексна діелектрична проникність, ε_0 – проникність вакууму, ε' – дійсна частина діелектричної проникності, ε'' – уявна частина діелектричної проникності, яка визначає втрати в середовищі. Електропровідність середовища σ пов'язана зі струмами провідності і діелектричними втратами співвідношенням:

$$\sigma = \varepsilon'' \omega \varepsilon_0, \quad (2.2)$$

де ω – частота.

Дисперсія уявної частини діелектричної проникності ε'' пов'язана з різними релаксаційним процесами, які супроводжують ефект поляризації. Діелектрична проникність і електропровідність тканин дозволяють визначити ефекти поширення ЕМП а також потенційно несуть інформацію про параметри біофізичних процесів, що протікають в біологічному об'єкті, та можуть мати діагностичну цінність. Для цього повинна бути вирішена задача інтерпретації електрофізичних властивостей через їх зв'язок з фізіологічними процесами. В цьому разі електрофізичні параметри становлять практичний інтерес не тільки як фактор, що впливає на поширення ЕМП в процесі роботи медичних приладів, а і як самостійний показник в біофізиці.

В рамках роботи розроблено електромагнітний сенсор для оцінки діелектричної проникності матеріалів оригінальної геометричної форми [17]. Топологію сенсора зображено на Рис. 2.3 А. Сенсор являє собою мікросмушковий резонатор, який складається з елементів мікросмушкової лінії в $3/4$ і $1/2$ частин кола. Таким чином, довжина резонатора l задається одним параметром – радіусом

кола r і дорівнює $l = 10\pi r$. Вибір такої форми обумовлений двома причинами. По-перше, така форма дозволяє отримати компактний датчик, його розміри в 1,6 разів менші за розміри кільцевого резонатора. По-друге, оптимізації потребує мінімальна кількість геометричних параметрів. Таким чином, вдалося знайти оптимальну форму мікросмужкового резонатора, розміри якого становлять $0,2\lambda$ для основної моди коливань, а кількість геометричних параметрів оптимізації дорівнює двом, а саме: товщина мікросмужкової лінії w і радіус елементів кіл r .

Збудження резонатора здійснюється через зосереджену ємність C . Конденсатор може розташовуватися в отворі, що висвердлено в діелектричній підкладці. Матеріал підкладки – тефлон, армований склом, товщиною $h_1 = 1,5$ мм. Над резонатором розташовується досліджуваний зразок товщиною h_2 (Рис. 2.3 В). Фото експериментально зразка резонатора показано на Рис. 2.3 Б.

Ця структура дозволяє проводити вимірювання діелектричної проникності матеріалів відомої товщини. Також, метод може бути розвинено для визначення діелектричної проникності одного шару в багат шаровому діелектрику при відомих параметрах інших шарів.

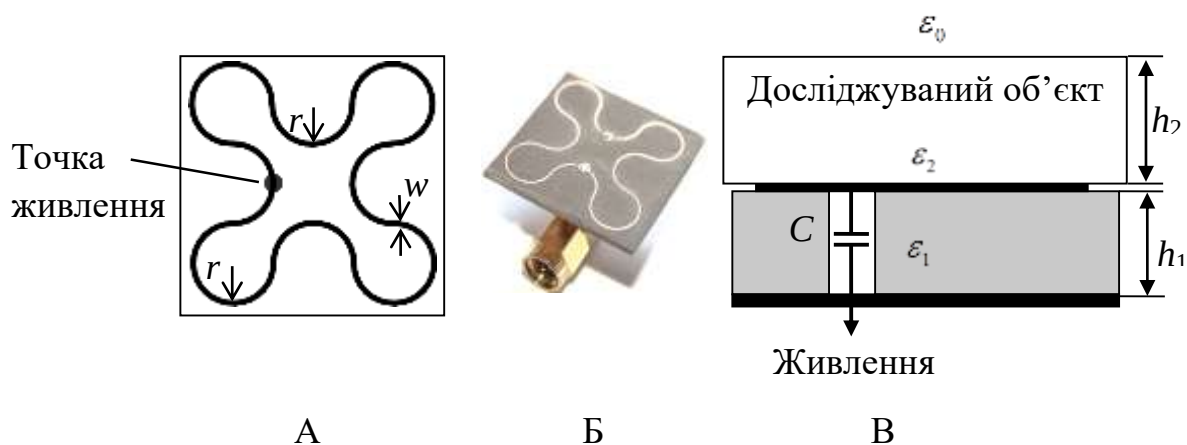


Рис. 2.3 Топологія мікросмужкового резонатора (А), експериментальний зразок резонатора (Б) та взаємне розташування резонатора та об'єкта дослідження (В)

За методом, розвиненим Jiri Svacina [106, 107], розраховували діелектричну проникність досліджуваного об'єкта ϵ_2 , вважаючи відовими діелектричну

проникність діелектрика ε_1 та вільного простору ε_0 , який знаходиться над досліджуванним об'єктом, за формулою:

$$\varepsilon_2 = \frac{\varepsilon_{eff} - q_0 \varepsilon_0 - q_1 \varepsilon_1}{q_2}, \quad (2.3)$$

де ε_{eff} – ефективна діелектрична проникність кола; $q_1, q_2, q_0 = 1 - q_1 - q_2$ – коефіцієнти заповнення, що визначають вплив кожного діелектричного шару на ефективну діелектричну проникність, які визначаються геометричними параметрами електромагнітного сенсора ω, h_1, h_2 (Рис. 2.3 А, В).

Ефективна діелектрична проникність розраховується як квадрат відношення вимірної резонансної частоти навантаженого резонатора f_l і резонансної частоти резонатора у вільному просторі f_0 :

$$\varepsilon_{eff} = \left(\frac{f_0}{f_l} \right)^2. \quad (2.4)$$

Об'єкт зондування повинен мати плоский зріз або бути еластичним і приймати плоску форму. Геометричні розміри мікросмужкового резонатора обираються згідно з робочою довжиною хвилі і розмірами досліджуваного об'єкта. Лінійні розміри резонатора повинні бути менше розмірів досліджуваного об'єкта, що дозволяє при розрахунках розглядати досліджуваний об'єкт як нескінченну напівплощину. Розміри резонатора можуть бути довільними, на їх вибір впливають такі вимоги: номер моди, на якій збуджується резонатор, максимальне узгодження імпедансу резонатора з опором генератора на частоті обраної моди, структура ЕМП в ближній зоні випромінювання.

В основі методу лежить явище зміни ефективного значення діелектричної проникності об'єкта, розташованого в ближній зоні реактивного поля мікросмужкового резонатора. Даний метод перспективний для дослідження діелектричних властивостей біологічних тканин, зокрема, крові. Експериментальна перевірка методу дозволяє використовувати сенсор для дослідження електрофізичних параметрів об'єктів досліджень даної роботи.

2.3.2 Метод коаксіального зонда для вимірювання дисперсії електропровідності та діелектричної проникності біопроб

Проведено дослідження можливостей і меж застосування методу відкритого кінця коаксіального хвильоводу для вивчення дисперсії діелектричної проникності рідин та твердих діелектриків [15]. Методу відкритого кінця коаксіального хвильоводу для дослідження властивостей діелектриків присвячені роботи [108-110]. Однак, незрозумілим залишається питання про межі застосування методу і про вибір простої і адекватної моделі відкритого кінця коаксіального хвильоводу. Також, поки не вирішена зворотна задача обчислення електрофізичних параметрів середовища, яка взаємодіє з електромагнітним полем відкритого кінця коаксіального хвильоводу. Прості, аналітичні методи оцінки електрофізичних параметрів тканин необхідні при створенні нових зразків діагностичних засобів.

Електрофізичні властивості більшості матеріалів, в тому числі і біологічних рідин, мають дисперсією, що дозволяє визначати об'ємні концентрації речовин в двокомпонентних розчинах, ступінь очищення речовини, проводити непрямий хімічний аналіз. Багато речовин мають діелектричну дисперсію з аномальним поглинанням в мікрохвильовому діапазоні частот, що дозволяє проводити радіоспектроскопію для їх ідентифікації.

Було враховано, що дослідження потребують контролю середовища в широкому діапазоні частот. Фото експериментальної установки показано на Рис. 2.4.



Рис. 2.4 Зовнішній вид експериментальної установки.

Для успішного проведення вимірювань необхідно здійснити калібрування приладу безпосередньо на конкретний зразок вимірювального зонда. Для цього, при стандартній процедурі калібрування, відкритий кінець хвилеводу замінюється на зонд, навантажений на вільний простір; замість короткозамкненого навантаження використовується зонд, відкритий кінець якого замкнутий металевою пластиною (алюмінієвою фольгою); в якості узгодженого навантаження використовується стандартний широкосмуговий термінатор:

$$Z = 50 + j0 \text{ Ом.} \quad (2.5)$$

Використовувати стандартні навантаження (короткозамикач і відкритий кінець) не можна через збіг навантажувальних площин зонда і калібрувальних навантажень, що призводить до фазових помилок вимірювань. Ознакою неправильного калібрування є зміна знаку фази коефіцієнта відбиття в використовуваному діапазоні частот.

Графічне зображення відкритого кінця коаксіального хвилеводу, зануреного в досліджувану середу, і еквівалентні схеми наведені на Рис. 2.5 А і Рис. 2.5 Б, В відповідно, де C_f – ємність, яка не залежить від досліджуваного середовища і обумовлена появою крайових полів всередині хвилеводу, а C_0 – ємність без втрат, обумовлена геометрією і крайовим полем відкритого кінця хвилеводу, навантаженого на вільний простір, ϵ^* – комплексна діелектрична проникність середовища, r – еквівалентний опір, обумовлений електропровідністю середовища, ϵ' – дійсна частина діелектричної проникності середовища.

Слід враховувати, що вимірювальний прилад, в процесі калібрування, компенсує ємність відкритого кінця коаксіального хвилеводу, навантаженого на вільний простір (відкритий кінець хвилеводу). Таким чином:

$$C = C_f + C_0, \quad (2.6)$$

що не відповідає дійсності.

Це призводить до того, що розрахункова діелектрична проникність вакууму дорівнюватиме 0. Тому до обчисленого значення діелектричної проникності додаємо 1.

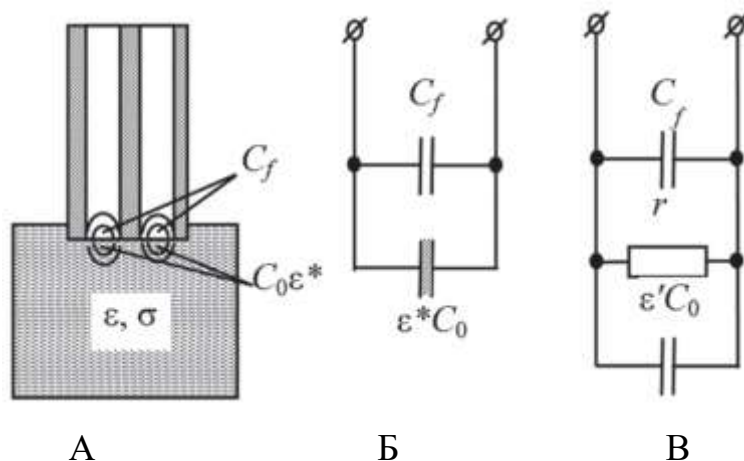


Рис. 2.5 Коаксіальний зонд, занурений в середовище (А) та еквівалентні схеми відкритого кінця хвилеводу (Б, В)

За виміряними значеннями уявної ImS_{11} і дійсної ReS_{11} частин коефіцієнта відбиття від зонда, навантаженого на досліджуване середовище, здійснюється розрахунок її параметрів за наступним алгоритмом.

1. Відповідно до паралельної схеми заміщення (Рис. 2.5 Б), здійснимо перехід від значень коефіцієнта відбиття до еквівалентного комплексного опору кола (2.6), (2.7):

$$ImZ = Z_0 \cdot \frac{1 - ReS_{11}^2 - ImS_{11}^2}{(1 - ReS_{11})^2 + ImS_{11}^2}, \quad (2.6)$$

$$ReZ = Z_0 \cdot \frac{2 \cdot ImS_{11}}{(1 - ReS_{11})^2 + ImS_{11}^2}. \quad (2.7)$$

2. Обчислюємо значення тангенса зсуву фази між струмом і напругою (2.8):

$$tg\varphi = \frac{ImZ}{ReZ}. \quad (2.8)$$

3. Обчислення абсолютних значень ємності та опору еквівалентного навантаження відкритого кінця хвилеводу можна здійснити, вирішуючи алгебраїчну систему рівнянь (2.9):

$$\begin{cases} |Z|^2 = \frac{\frac{1}{r^2}}{\left(\frac{1}{r^2} + \omega^2 \cdot C^2\right)} + \frac{\omega^2 \cdot C^2}{\left(\frac{1}{r^2} + \omega^2 \cdot C^2\right)}, \\ tg\varphi = -\omega \cdot r \cdot C \end{cases} \quad (2.9)$$

де перше рівняння – модуль повного опору еквівалентного кола $|Z|$, друге – тангенс зсуву фази між струмом і напругою.

Рішення системи рівнянь щодо параметрів C (2.10) і r (2.11) дає наступні результати:

$$C = \frac{1}{|Z| \cdot \omega} \cdot \sqrt{\frac{tg^2 \varphi}{(1 + tg^2 \varphi)}}, \quad (2.10)$$

$$r = |Z| \cdot \sqrt{1 + tg^2 \varphi}. \quad (2.11)$$

4. Обчислюємо дійсну частину діелектричної проникності (2.12) (враховуємо компенсацію вимірювальним приладом ємності відкритого кінця коаксіального хвилеводу, навантаженого на вільний простір):

$$\varepsilon' = Ck + 1, \quad (2.12)$$

де k – коефіцієнт пропорційності, обумовлений геометрією коаксіального зонда.

5. Обчислюємо питому електропровідність.

$$\sigma = \frac{1}{r} \cdot k. \quad (2.13)$$

6. Обчислюємо уявну частину діелектричної проникності:

$$\varepsilon'' = \frac{\sigma}{\omega \varepsilon_0}. \quad (2.14)$$

7. Обчислюємо тангенс кута діелектричних втрат:

$$tg \delta = \frac{\varepsilon''}{\varepsilon'}. \quad (2.15)$$

В якості калібрувальної речовини для обчислення коефіцієнта пропорційності k можна використовувати діелектрики, що не проявляють дисперсії в розглянутому діапазоні частот, наприклад, вазелінове масло ($\varepsilon' = 2$).

2.3.3 Амплітудно-фазовий детектор для систем діелектричної спектроскопії

Метод, що використовується в роботі, заснований на вимірюванні різниці амплітуд і фази між опорним і вимірювальним каналами. Оскільки амплітуди на

входах детекторів можуть істотно відрізнятися, то особливою вимогою до амплітудно-фазового детектора є мінімальна незалежність точності вимірювання фази від амплітуд сигналів. Одним з таких методів є метод трьох амплітуд [111-113] на основі якого розроблено технічне рішення амплітудно-фазового детектора, який дозволяє вимірювати амплітуди і різниця фаз двох сигналів в діапазоні частот від постійного струму до 100 МГц. Метод трьох амплітуд реалізується вимірюванням амплітуд опорного і вимірювального каналів, а також, амплітуди сумарного сигналу або різниці сигналів.

Нами був розроблений амплітудно-фазовий детектор [16], в основі принципу роботи якого лежить метод трьох амплітуд, з частотним діапазоном від постійного струму до 100 МГц для систем діелектрометрії і імпедансної спектроскопії. Для систем імпедансної спектроскопії обрано схему з сумматором сигналів як таку, що забезпечує мінімальну похибку в різниці фаз (не більше $0,2^\circ$) при запропонованому нами способі калібрування.

Розроблений детектор використовувався в рамках роботи для реалізації методу імпедансної спектроскопії для дослідження електрофізичних властивостей біологічних рідин, їх компонентів, культур клітин, та має прикладне значення в бофізичних дослідженнях.

2.3.4 Визначення електропровідності рідких біологічних середовищ по S-параметрам за допомогою векторного аналізатора електричних кіл

Зразки цільного молозива, знежиреного молозива і розчину низькомолекулярних компонентів молозива (НКМ), зразки суспензій клітин кісткового мозку об'ємом 1 мл вносили в тефлонову комірку, яка була підключена до двох портів векторного аналізатора ZNB 40 «Rohde & Schwarz».

Температуру зразків контролювали за допомогою термометра на термопарі з точністю до $0,1^\circ\text{C}$. Щоб уникнути завад, що вносяться в вимірювання електропровідності термопарою, вимірювання температури зразка проводилося в проміжках між вимірюваннями електропровідності.

Програмне забезпечення аналізатора «Rohde & Schwarz» ZNB 40 дозволяє отримувати автоматично розраховані за коефіцієнтами пропускання S_{21} значення дійсної $Re(Z < -S_{21})$ і уявної $Im(Z < -S_{21})$ частини імпедансу вимірювальної комірки, що визначаються модулем імпедансу вимірювальної комірки $|Z|$ та різниці фаз між сигналами на входах аналізатора $\Delta\varphi$ (2.16), (2.17).

$$Re(Z < -S_{21}) = \frac{|Z|}{\sqrt{1 + tg^2(\Delta\varphi)}} \quad (2.16)$$

$$Im(Z < -S_{21}) = \pm \frac{|Z|}{\sqrt{1 + \frac{1}{tg^2(\Delta\varphi)}}} \quad (2.17)$$

Для обчислення електропровідності рідини здійснюється математичний перехід від імпедансу вимірювальної комірки до еквівалентних параметрів електричного кола. Еквівалентну схему вимірювальної комірки представимо у вигляді паралельного з'єднання конденсатора і резистора. Тоді еквівалентна ємність C і еквівалентний опір R кола можуть бути обчислені через дійсну і уявну частини імпедансу за наступними формулами:

$$C = - \frac{1}{\omega \cdot \left(\frac{Re(Z < -S_{21})^2 + Im(Z < -S_{21})^2}{Im(Z < -S_{21})} \right)}, \quad (2.18)$$

$$R = Re(Z < -S_{21}) + \frac{Im(Z < -S_{21})^2}{Re(Z < -S_{21})}, \quad (2.19)$$

де ω – циклічна частота електричного струму.

Електропровідність вмісту вимірювальної комірки, крім властивостей речовини, визначається геометричними параметрами комірки. Щоб виключити вплив геометричних параметрів комірки, результати були представлені у вигляді значень питомої електропровідності σ :

$$\sigma = k \cdot \frac{1}{R}. \quad (2.20)$$

Коефіцієнт $k = 175 \text{ м}^{-1}$ було обчислено для циліндричної комірки, що використовувалася, ємністю 1 мл з використанням калібрувальних розчинів з відомою питомою електропровідністю.

Модуль діелектричної проникності зразків було обчислено за формулою:

$$\varepsilon = k \frac{C}{\varepsilon_0} \quad (2.21)$$

або:

$$|\varepsilon| = \frac{k \cdot \operatorname{Im}(Z < -S_{21})}{2\pi f \varepsilon_0 \cdot \left(\operatorname{Re}(Z < -S_{21})^2 + \operatorname{Im}(Z < -S_{21})^2 \right)}, \quad (2.22)$$

де f – частота, ε_0 – діелектрична проникність вакууму.

Висновки до розділу 2

В даному розділі було використано наступні методи: імпедансна спектроскопія (вимірювання електропровідності та діелектричної проникності об'єктів дослідження), мас-спектрометрія (визначення білкового складу зразків), адсорбційна спектрофотометрія (визначення вмісту іонів міді), конфокальна мікроскопія (візуалізація клітин та визначення вмісту вільних форм кисню), оптична мікроскопія (визначення кількості та морфотипів клітин кісткового мозку), культивування клітин кісткового мозку в культурі *in vitro*, метод непараметричної статистики (Манна – Уїтні).

Для реалізації методу імпедансної спектроскопії як основного методу досліджень запропоновано для використання оригінальну конструкцію мініатюрного мікросмужкового резонатора, сенсора на коаксіальному зонді та амплітудно-фазового детектора, які апробовано у якості сенсора діелектричних властивостей твердих і рідких матеріалів.

Даний електромагнітний сенсор має перспективи застосування у системах діелектрометрії для тестування об'єктів з одностороннім доступом. В основі методу лежить ефект зміни ефективного значення діелектричної проникності шару, що знаходиться у безпосередній близькості мікросмужкового резонатора.

Ці методичні рекомендації були використані в наступних публікаціях [13-22].

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ

3.1 Експериментальне дослідження електрофізичних параметрів одно- та двокомпонентних модельних середовищ.

3.1.1 Експериментальне дослідження електрофізичних параметрів однокомпонентних твердих діелектриків і розчинів хлориду натрію та глюкози у фізіологічних концентраціях

Діелектричну проникність для випадку однокомпонентних діелектриків вимірювали для трьох матеріалів: тефлон, скло та оксид алюмінію [17]. Спостерігається зменшення резонансної частоти при збільшенні діелектричної проникності досліджуваного об'єкта (Рис. 3.1). Товщина зразка становить 3 мм.

На Рис. 3.1 представлені залежності резонансної частоти резонатора для перших трьох мод від діелектричної проникності досліджуваного зразка.

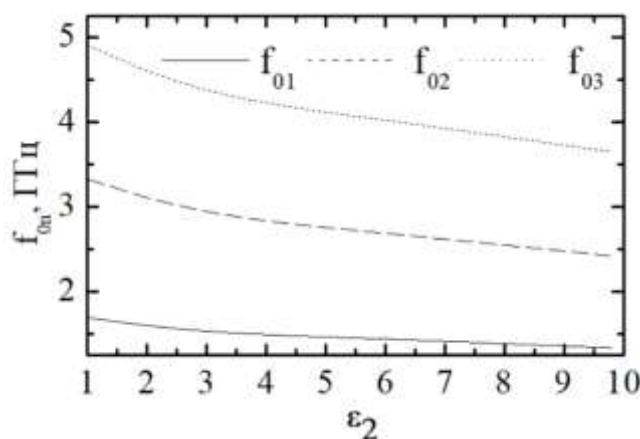


Рис. 3.1 Теоретична залежність частоти резонансу від діелектричної проникності.

З точки зору отримання більш точних результатів, доцільно проводити вимірювання на більш високих модах, оскільки при більшому куту нахилу

залежності однакове змінення діелектричної проникності матеріалу, що досліджується, призводить до більшого зсуву частоти, який вимірюється, що збільшує чутливість методу.

Результати тестування матеріалів з малими діелектричними втратами та повітря наведені в Табл. 3.1.

Таблиця 3.1

Результати вимірювань твердих діелектриків.

Матеріал	Встановлене значення	Виміряне значення	Відносна похибка, %
Повітря	1,00019	1,0024	0,22
Тефлон	2,1	2,1394	1,88
Скло	5,5	4,9865	9,34
Оксид алюмінію	9,8	9,8425	0,43

Після співпадіння вимірних за допомогою мікросмужкового резонатора значень діелектричної проникності однокомпонентних середовищ з відомими встановленими значеннями проведемо дослідження рідкого полярного діелектрика – водного розчину глюкози. Вимірювальна комірка (Рис. 3.2) являє собою резонатор, над яким розташована ємність або кювета з досліджуваною рідиною. Відомо, що дистильована вода при нормальних умовах має діелектричну проникність $\varepsilon = 81$.



Рис. 3.2 Вимірювальна комірка

Електродинамічні властивості досліджуваного об'єкта обрані виходячи з властивостей біологічних тканин з високим вмістом води [114]. Наприклад, зміна діелектричної проникності крові при зміні концентрації глюкози в діапазоні від 0,7 г / л до 1,5 г / л, при постійній температурі, частоті і провідності приблизно становить $\Delta\epsilon \approx 0,05$.

На Рис. 3.3 представлено експериментальні залежності коефіцієнтів відбиття резонатора від частоти при різних концентраціях глюкози у водному розчині. З графіків видно, що зміна діелектричної проникності на 0,06 % призводить до помітного зсуву частоти резонансу на 3 МГц. Даний ефект пов'язаний зі зміною ефективного значення діелектричної проникності, яка може бути обчислена за формулою:

$$\epsilon_{\text{еф}} = \epsilon_1 \mu + \epsilon_2 (1 - \mu), \quad (3.1)$$

де ϵ_1 – діелектрична проникність води, ϵ_2 – діелектрична проникність глюкози, μ – об'ємна концентрація води. Таким чином, даний підхід може бути використаний для вимірювання концентрації глюкози в крові людини *in vitro*.

Виявлено, що чутливість до зміни діелектричної проникності та провідності зростає з частотою. Тому для подальших вимірювань та аналізу було обрано частоту резонансу $f_p \approx 1,3$ ГГц.

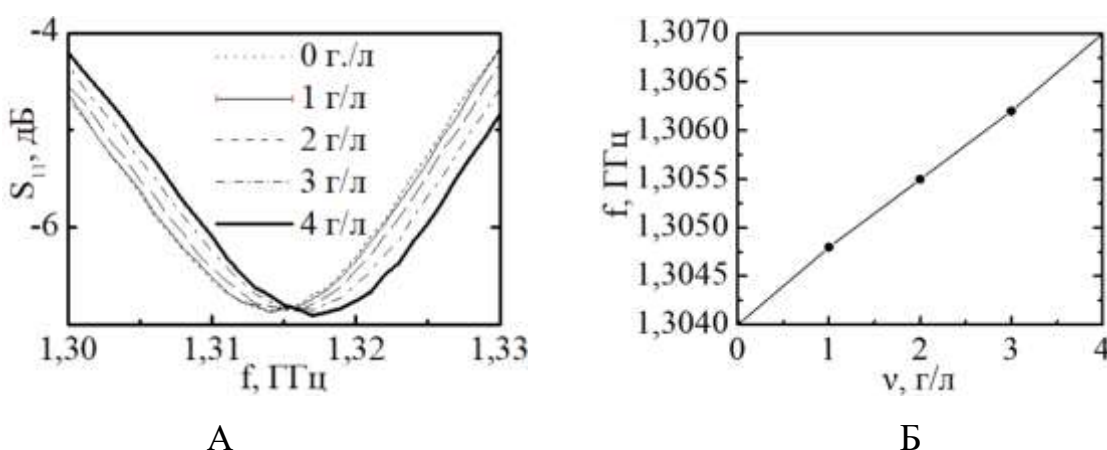


Рис. 3.3 Залежність коефіцієнта відбиття для різних концентрацій глюкози (А) і залежність частоти резонансу від концентрації глюкози у воді (Б).

На Рис. 3.4 представлено серію експериментально отриманих графіків, які характеризують поведінку коефіцієнта відбиття резонатора в залежності від електропровідності водно-сольового розчину. При збільшенні концентрації солі у воді резонанс стає гладким, що свідчить про зростання струму провідності, і, як наслідок, про зниження добротності системи.

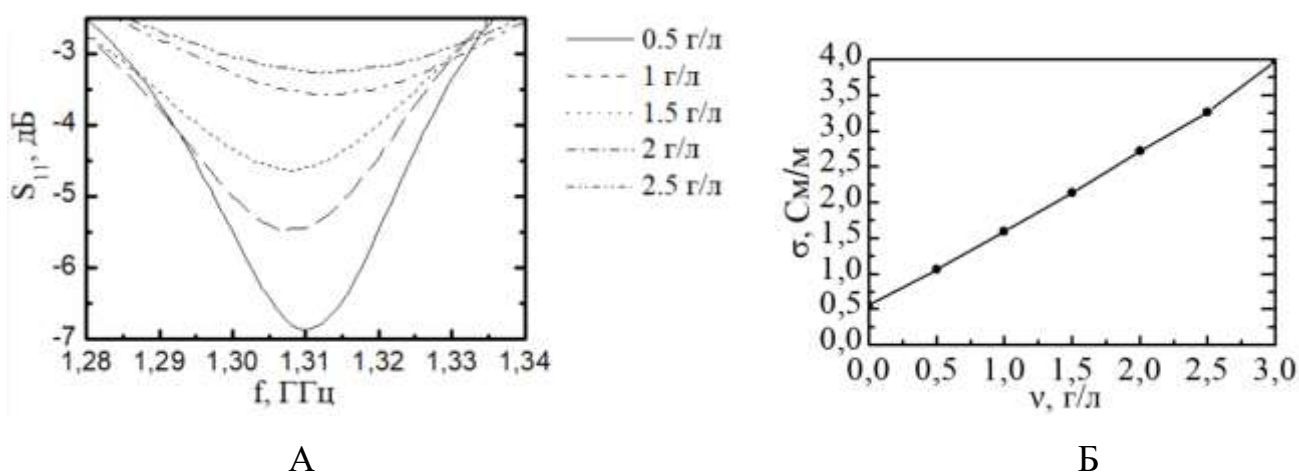


Рис. 3.4 Частотна залежність коефіцієнта відбиття від концентрації солі у воді (А) та залежність провідності від концентрації (Б).

Отримані результати підтверджують, що між електропровідністю та концентрацією іонів є залежність, що є лінійною в діапазоні концентрацій, що є наявними в біологічних системах. Це, по-перше, вказує на можливість застосування розроблених сенсорів для дослідження іонного складу компонентів біологічних рідин. Електрична провідність суцільної крові на 70% визначається присутніми у плазмі солями (головним чином хлоридом натрію). У людському організмі концентрація солей у крові може знаходитись у межах від 0,5 г/л до 1,5 г/л, що покривається діапазоном отриманої лінійної залежності. По-друге, при дослідженні складних багатокомпонентних середовищ потрібно враховувати наявність в них іонів, що може накладати обмеження на методику проведення досліджень та інтерпретацію зв'язку електропровідності зі складом багатокомпонентних середовищ.

3.1.2 Експериментальне дослідження зв'язку електропровідності суспензій наночастинок з їх фізико-хімічними властивостями

3.1.2.1 Метод підвищення ефективності технології отримання наночастинок методом лазерної абляції шляхом додаткового нагрівання мішені

У процесі отримання наночастинок методом лазерної абляції спостерігалися відмінні властивості плазмового факела під час наносекундної лазерної абляції залізної мішені без додаткового нагрівання та з додатковим нагріванням. Структурні (Рис. 3.5 А Б) і спектральні (Рис. 3.5 В) порівняння проведено відповідно для базової температури 100 °С і підвищеної температури 500 С з використанням густини енергії лазерного випромінювання 10 Дж / см².

Виявлено значне збільшення яскравості плазми і добре виражену конічну форму плазмового факела при підвищеній температурі. Більш високий вміст кисню в підданому абляції матеріалі, що виявляється в сильному посиленні ліній O(I) на 777 нм і 844 нм в спектрі плазми при підвищеній температурі, також вказує на присутність окислених частинок в мішені і матеріалі, що піддався абляції.

Ці зміни можуть бути пояснені з точки зору прискорення окислення заліза, яке зазвичай збігається з підвищенням температури, і це посилення може відображатися на лінійній, параболічній або логарифмічній швидкості росту окисленої плівки. Отримані плівки оксиду заліза мають більш низькі коефіцієнти оптичного поглинання, ніж металеве залізо, і дозволяють проникати на велику глибину матеріалу за рахунок енергії, що міститься в падаючому лазерному імпульсі.

Кількісна оцінка посилення лазерної абляції, викликаного додатковим нагріванням, була виконана шляхом вимірювання ефективності генерації часток для ряду густин енергії лазерного випромінювання в діапазоні від 3,8 до 24,54 Дж / см².

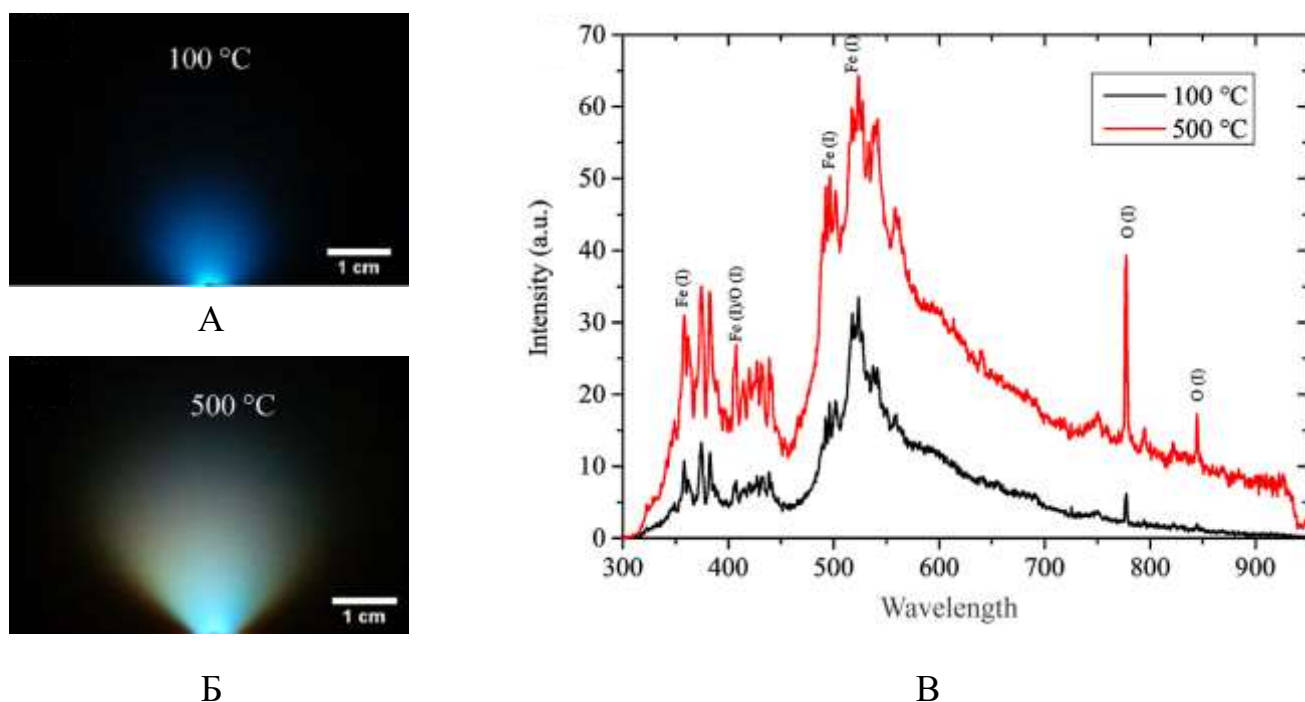


Рис. 3.5 Плазмові шлейфи, які генеруються лазерним опромінюванням залізної мішені наносекундними лазерними імпульсами $10 \text{ Дж} / \text{см}^2$ при температурі попередньо нагрітої мішені $100 \text{ }^\circ\text{C}$ (А), $500 \text{ }^\circ\text{C}$, (Б) і відповідні спектри випромінювання плазми як залежність інтенсивності сигналу (Intensity) від довжини хвилі (Wavelength) (В). Спектри отримані з використанням часу інтегрування спектрометра 500 мс , а затримка між імпульсами в одній точці становила $6,2 \text{ с}$ в обох випадках.

Ефективність генерації розраховувалася як відношення видаленої маси мішені m_Δ до повної енергії отриманого мішенню лазерного випромінювання $E_{\text{лаз}}$:

$$\eta = \frac{m_\Delta}{E_{\text{лаз}}}. \quad (3.2)$$

Ефективність зростає зі збільшенням густини енергії лазерного випромінювання при еталонному вимірюванні при базовій температурі $100 \text{ }^\circ\text{C}$, як видно на Рис. 3.6 (синя лінія) і підтверджується більш ранніми роботами [115-117], досягаючи $0,86 \text{ мкг} / \text{Дж}$ при $24,54 \text{ Дж} / \text{см}^2$.

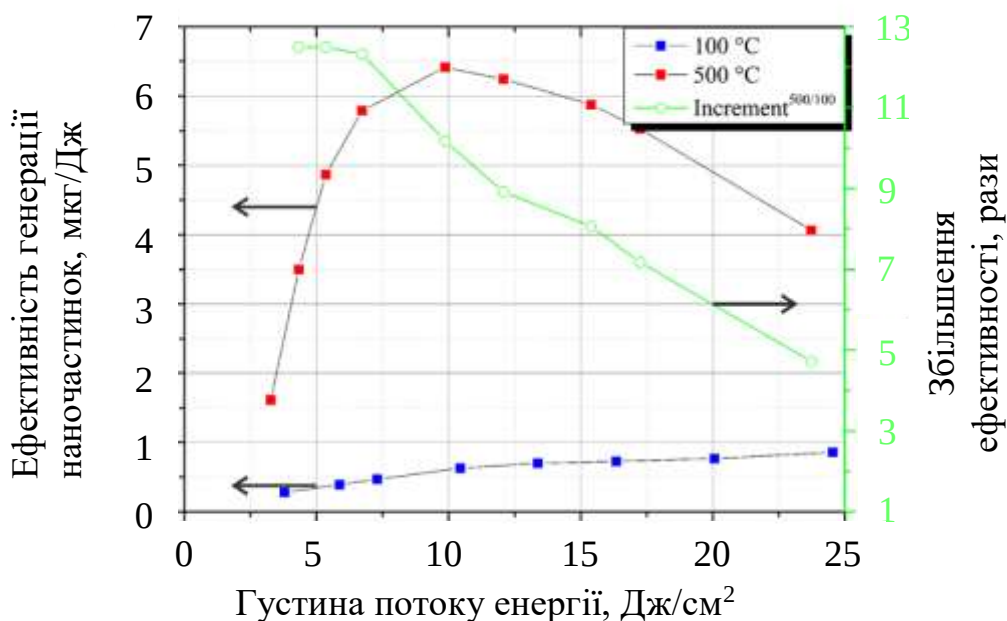


Рис. 3.6 Ефективність генерації наночастинок, отримана при застосуванні наносекундних лазерних імпульсів з потоком енергії 3,8 – 24,54 Дж / см² при температурах мішені 100 °C (синя лінія) і 500 °C (червона лінія). Затримка між імпульсами в кожній точці в обох випадках становить 6,2 с. Зелена лінія вказує збільшення (Increment^{500/100}) ефективності процесу як відношення ефективності при 500 °C до ефективності при 100 °C.

Вимірювання при 500 °C показує значне підвищення ефективності у всьому дослідженому діапазоні густини енергії, і досягається максимальна ефективність генерації наночастинок 6,41 мкг / Дж. Примітно, що максимальна ефективність складає близько 10 Дж / см², тоді як максимальне збільшення ефективності в 12 разів досягається при 6,29 Дж / см² і більш низькій густині потоку енергії, як видно з Рис. 3.6.

Наявність оптимальної густини потоку лазерного випромінювання можна пояснити співіснуванням і конкуренцією безлічі процесів, які присутні під час лазерної абляції, що підтримується додатковим нагріванням. Зростання оксидної плівки збільшує генерацію частинок, але її швидкість і кінцева товщина оксидної плівки визначаються температурою цілі і затримкою між точками. За умови, що густина енергії достатня для повного проникнення і видалення цього оксидного шару, має місце менш ефективна абляція нижніх шарів заліза. З іншого боку,

доставка лазерної енергії призводить до додаткових втрат зі збільшенням густини енергії: наносекундні лазерні імпульси зазнають плазмове відбиття і розсіювання на викинутих частинках, що пов'язано з досить великою тривалістю імпульсу і характерними часовими рамками виникнення плазмового факела.

Ефективність генерації частинок було досліджено в залежності від температури шляхом порівняння двох різних затримок між імпульсами на одну точку t_{del} , які дорівнювали 1 с і 6,2 с, при фіксованій густині енергії лазера 6,29 Дж / см². Як видно на Рис.3.7, найвищої ефективності генерації частинок в обох випадках було досягнуто при найвищій із досягнутих в експерименті температур 600 °С.

Вертикальний позитивний зсув кривої, що відповідає затримці в 1 с, можливо, пов'язаний з додатковою потужністю лазерного випромінювання (1 с – 2,26 Вт проти 6,2 с – 0,36 Вт, в порівнянні з потужністю електричного нагріву 10-130 Вт). Ще одна помітна відмінність між двома затримками між імпульсами на точку – це профілі кривих ефективності. Ефективність при затримці 1 с зростала лінійно у всьому температурному діапазоні, тоді як в разі затримки 6,2 с графік демонстрував дві одласті з різними кутами нахилу з граничною температурою ~250 °С. Його поведінка добре узгоджується з кінетичною теорією Фромхолда-Кука про зростання оксидної плівки на металевих поверхнях, яка стверджує, що початкова стадія окислення залежить від подачі реагенту і швидкості реакції, тоді як для більш товстих оксидних плівок вона залежить від перенесення електронів до межі області реакції і може бути посилена термоелектронною емісією через окислений шар [118-120].

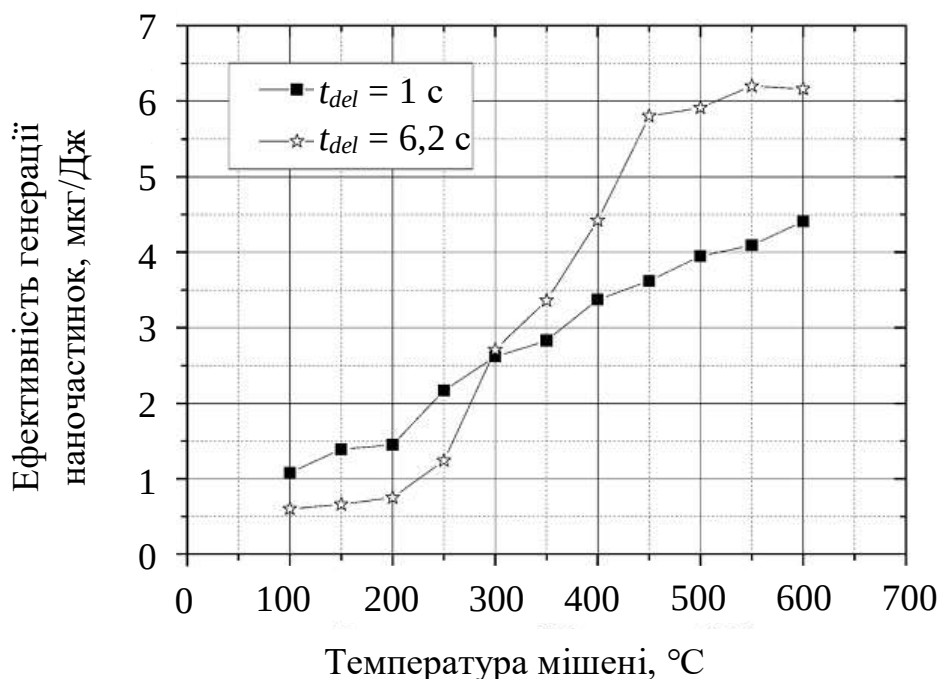


Рис. 3.7 Залежність ефективності генерації наночастинок від заданої температури мішені при затримках між імпульсами t_{del} 1 с і 6,2 с. Густина випромінювання в обох випадках склала 6,29 Дж / см².

Отже, коли температура збільшується і залишається більше часу для реакції окислення, зростання оксиду описується параболічною залежністю, що призводить до різкого збільшення і насичення ефективності генерації часток в разі затримки 6,2 с на точку між імпульсами.

Взаємозв'язок підсилення абляції за допомогою термічної обробки і кінетики окислення додатково підтверджується дослідженням ефективності генерації наночастинок в залежності від затримки між імпульсами на точку. Такі залежності для густини енергії лазерного випромінювання 6,29 Дж / см² і 22,64 Дж / см² представлені на Рис. 3.8. Мішень при температурах 100 °C, 400 °C, 500 °C і 600 °C досліджувалася при обох значеннях густини енергії лазерного випромінювання. В обох випадках спостерігалось швидке підвищення ефективності зі збільшенням затримки між точками.

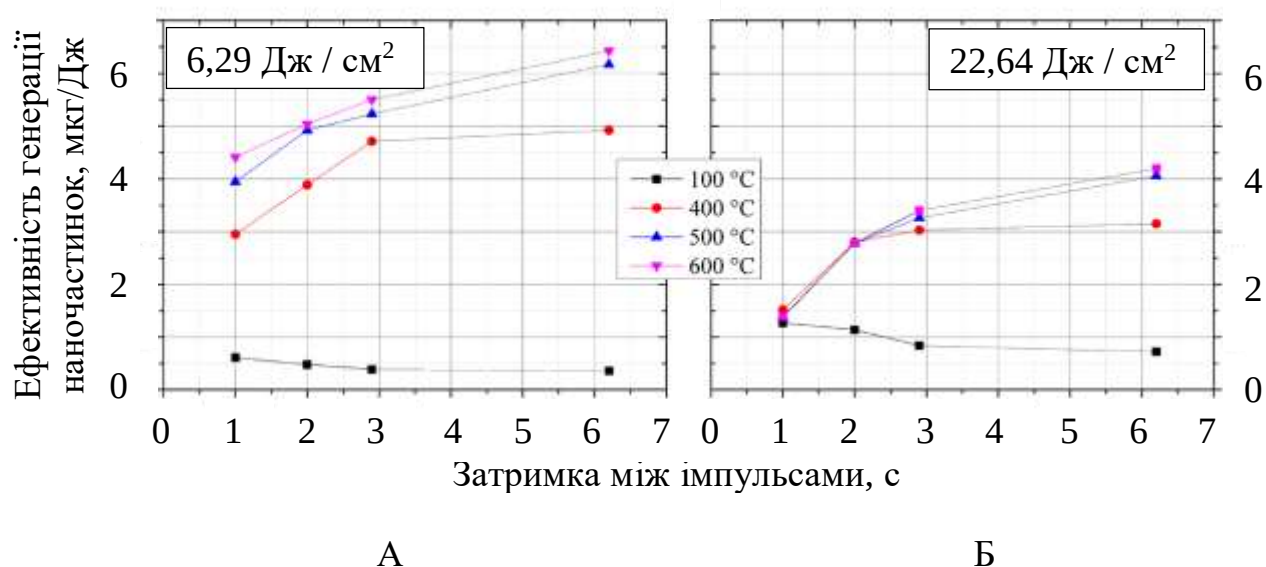


Рис. 3.8 Ефективність генерації наночастинок при температурах мішені 100-600 °С в залежності від затримки між імпульсами в точці для густини випромінювання 6,29 Дж / см² (А) і 22,64 Дж / см² (Б).

Найвище значення 6,41 мкг / Дж було досягнуто при більш низькій густині енергії, оскільки вона зазнає меншого впливу від взаємодії плазми з пучком і може отримати більше переваг від процесу відколу, якщо глибина абляції, що залежить від енергії імпульсу, відповідає товщині оксидного шару. На відміну від цього, деяке помітне зниження ефективності спостерігається під час абляції при базовій температурі 100 °С (чорна лінія на Рис. 3.8 А, Б) і коротких затримках між імпульсами на точку (більш висока частота повторення падаючих лазерних імпульсів). Це можна пояснити більш сильним лазерним нагрівом при більш коротких затримках, який присутній в точці, але не виявляється вимірювачем температури. В цілому, наші результати показали, що для ефективного утворення наночастинок із залізних мішеней, які піддаються окисленню, необхідні тривалі затримки між імпульсами, що перевищують 3 с. Також очевидно, що через нелінійний характер кінетики росту оксиду температура 500 °С на практиці є достатньо високою для отримання помітного посилення генерації.

Склад матеріалу, отриманого після прискореного внаслідок нагріву окислення залізної мішені в атмосфері повітря зі зниженим тиском, і наночастинок, утворених

лазерною абляцією, був проаналізований з використанням XRD і TEM відповідно (Рис. 3.9). Зразки для обох вимірювань були підготовлені шляхом застосування температури мішені 500 °С, затримки між імпульсами 6,2 с на точку, густини енергії лазерного випромінювання 10 Дж / см² і впливу на мішені 5760 лазерних імпульсів. Вимірювання XRD (Рис. 3.9 А) показує, що основною фазою оксиду заліза, що утворюється на поверхні мішені в цих експериментальних умовах, є магнетит (Fe_3O_4). Співіснування структурно подібного маггеміта ($\gamma\text{-}Fe_2O_3$) можна виключити через відсутність його інтенсивного дифракційного піку в площині (300) при $2\theta = 37,5^\circ$, як показано на вставці на Рис. 3.9 А.

Піки заліза, видимі на рентгенограмі, з'являються через невелику товщину оксиду, що покриває залізну мішень. З іншого боку, ніяких міжплощинних відстаней, які відповідали б виключно залізу (наприклад, 1,17 Å з (211)), не було виявлено під час дослідження TEM зображень отриманих наночастинок. Щоб розрізняти ці дві кристалічні фази оксиду заліза, можна взяти до уваги площину (110) маггеміта (на основі тих же довідкових даних XRD). Оскільки для декількох досліджених частинок не було виявлено відповідних відстаней 5,9 Å, весь кристалічний вміст отриманих наночастинок ідентифіковано як магнетит, як показано на Рис. 3.9 Б з площинами (111), (311) і (220). Такий склад наночастинок може бути пояснений утворенням магнетиту на мішені під час лазерного опромінення і ймовірним відколом, тобто процесами прямого відриву і фрагментації тонкої плівки. Фаза магнетиту також біж імовірна через її більш низький ступінь окислення, а оскільки йдеться про абляцію неокисленої залізної мішені, а також для ймовірного (якщо він є) переходу маггеміта в гематит ($\alpha\text{-}Fe_2O_3$), останній не виявляється методом XRD.

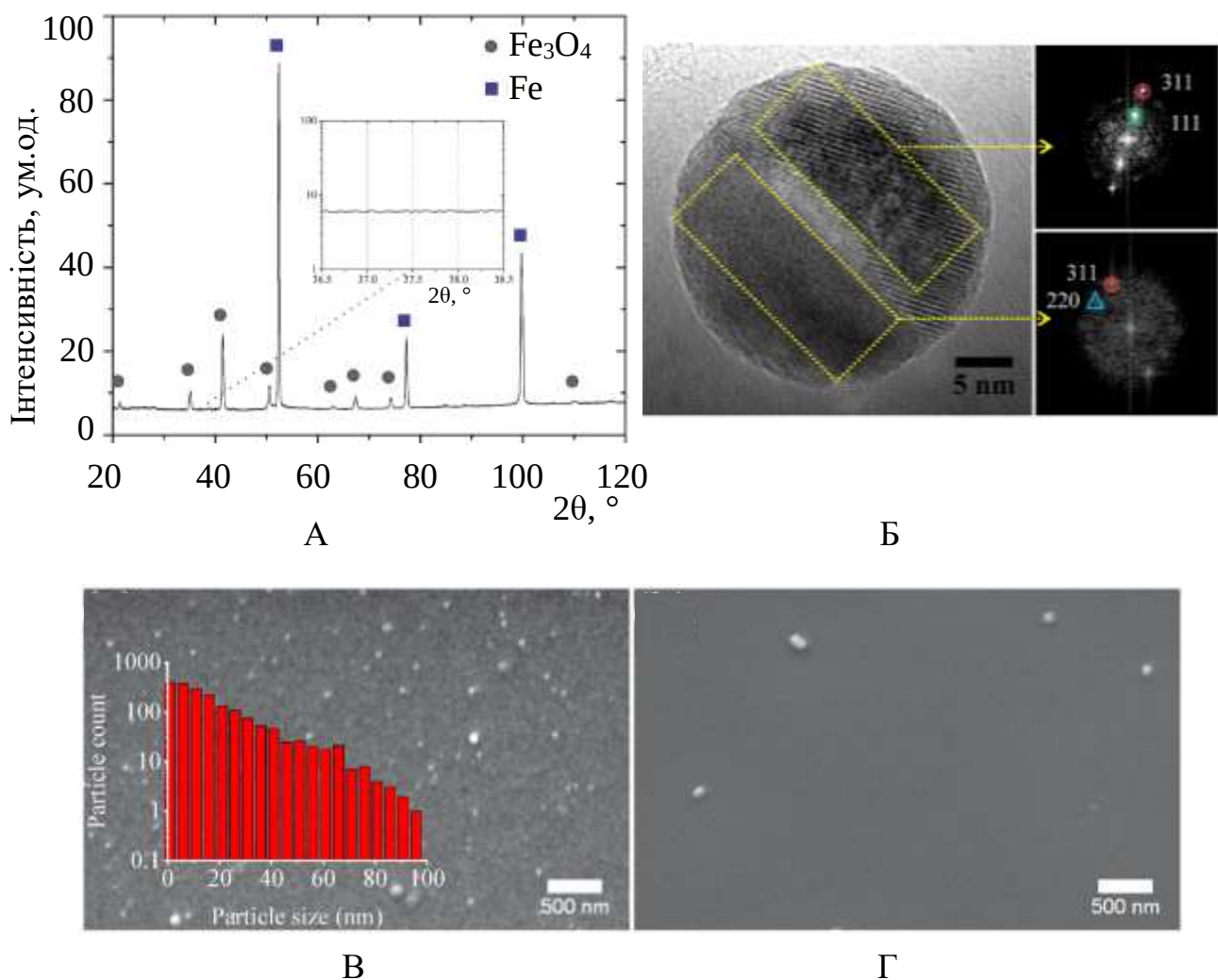


Рис. 3.9 XRD рентгенограма поверхні мішені, яка піддалася термічній абляції при 500 °C, 10 Дж / см² з затримкою між імпульсами 6,2 с на точку (А). TEM зображення та індексовані патерни наночастинок, отриманих в тих же умовах (Б). СЕМ-зображення, які порівнюють наночастинок, отримані при тих же умовах (В), та наночастинок, отримані при тих же умовах без нагрівання до 500 °C (Г). На вставці в (В) показано розподіл кількості наночастинок (Particle count) за розмірами (Particle size).

Представлено СЕМ-зображення наночастинок, отриманих при впливі густині енергії лазерного випромінювання 10 Дж / см² при 500 °C (Рис. 3.9 В) і 100 °C (Рис. 3.9 Г) на залізну мішень. Генерація наночастинок в цих двох випадках йшла різними маршрутами: в обох випадках генерувалися в основному дрібні наночастинок розміром менше 50 нм, проте кількість частинок розміром менше

10 нм була значно вищою в разі нагрітої мішені. Крім того, на відміну від типових вузьких розподілів частинок, утворених в результаті абляції, описаних в літературі [121], абляція з супроводженням нагріванням призвела до добре ідентифікованого експоненціального розподілу за розмірами. Ці спостереження можна пояснити тим фактом, що процес абляції фізично локалізований на оксидній плівці, яка має фіксовану швидкість росту для даної температури і затримки між імпульсами в кожній точці. Змінюючи ці два параметри, можна довільно регулювати товщину оксидної плівки, а також налаштовувати густину енергії лазерного випромінювання відповідно до неї, що призводить до утворення тільки дрібних наночастинок.

Ми продемонстрували метод лазерної абляції, супроводжений нагріванням, що значно збільшує ефективність генерації наночастинок тривалентного заліза до 6,41 мкг / Дж. Цей процес підходить для швидкого і ефективного прямого синтезу або осадження наночастинок оксиду заліза в атмосфері повітря зі зниженим тиском і для використання наносекундних лазерів промислового класу з високою середньою потужністю. Видалення матеріалу і пошвидшення генерації наночастинок корелювали з температурою мішені і були експериментально пов'язані з окислювальними процесами, що відбуваються на поверхні залізної мішені під час затримки між імпульсами в кожній точці. Шляхом управління процесами окислення поверхні мішені і відповідного налаштування параметрів лазерної абляції можна оптимізувати генерацію частинок і підвищити ефективність до 12,5 разів. Наночастинки продуктів термічної абляції були досліджені з використанням мікроскопів СЕМ і ТЕМ, довівши, що утворюються наночастинки, що містять кілька доменів кристалічного магнетиту і мають сферичну морфологію. Продемонстрована технологія нагріву дозволяє проводити лазерну генерацію наночастинок діаметром до 1 нм з експоненціальним розподілом розмірів і забезпечує прийнятне обмеження розміру.

3.1.2.2 Дослідження зв'язку електропровідності суспензій наночастинок заліза та платини з їх концентрацією та способом просторового розподілу в рідині

Досліджено водні суспензії з двома видами металевих наночастинок: заліза та платини. Незважаючи на різні електрофізичні властивості цих металів, при вимірюванні провідності суспензій суттєвих відмінностей не спостерігається.

Було виявлено, що два основних фактори, що впливають на електропровідність суспензій наночастинок металів, – це концентрація та характеристики розподілу наночастинок в рідині. Електропровідність вимірювали за допомогою вимірювальної комірки, еквівалентну схему якої можна представити як конденсатор.

Під час досліджень впливу наявності наночастинок у воді на її електропровідність в широкому діапазоні частот, встановлено, що найбільш інформативним для якісного та кількісного аналізу водних розчинів, суспензій, біологічних рідин і фармацевтичних препаратів є діапазон від 1 кГц до 100 МГц.

На Рис. 3.10 показано дві частотні залежності модуля імпедансу для дистильованої води та водної суспензії наночастинок заліза. На графіку відстежується «частотне вікно» приблизно до 100 кГц, де відстежується зміна провідності в залежності від наявності наночастинок.

Саме на низьких частотах відстежується залежність електрофізичних властивостей від таких параметрів, як іонний склад, концентрація складових розчину, наявність хімічних комплексів. До того ж, частотний діапазон проведення досліджень обмежується типом та розмірами вимірювальної комірки.

Ефект змінення електропровідності суспензії використано для оптимізації процесу отримання наночастинок методом лазерної абляції у рідині. У процедурі важливим є зупинити процес в момент, коли приріст маси сповільнюється. В цей час процес фрагментації наночастинок, які вже містяться у розчиннику, починає вносити вагомий внесок порівняно з процесом утворення нових. Фрагментація є небажаною, бо призводить до збільшення дисперсії розмірів наночастинок.

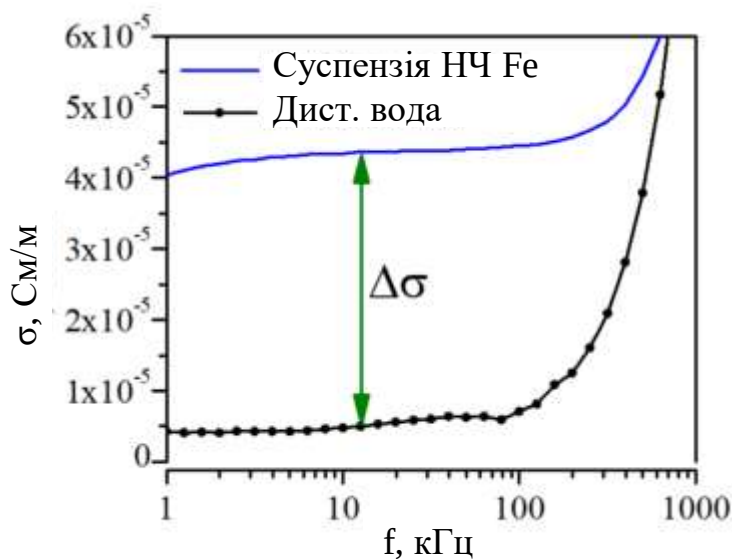


Рис. 3.10 Частотні f залежності провідності σ дистильованої води та суспензії наночастинок заліза.

На Рис. 3.11 показані залежності маси наночастинок у суспензії від часу абляції. Масу було виміряно двома методами: прямим методом (вимірювання зменшення маси мішені за допомогою вагів) та непрямим (обчислення маси частинок у суспензії за даними модуля імпедансу вимірювальної комірки).

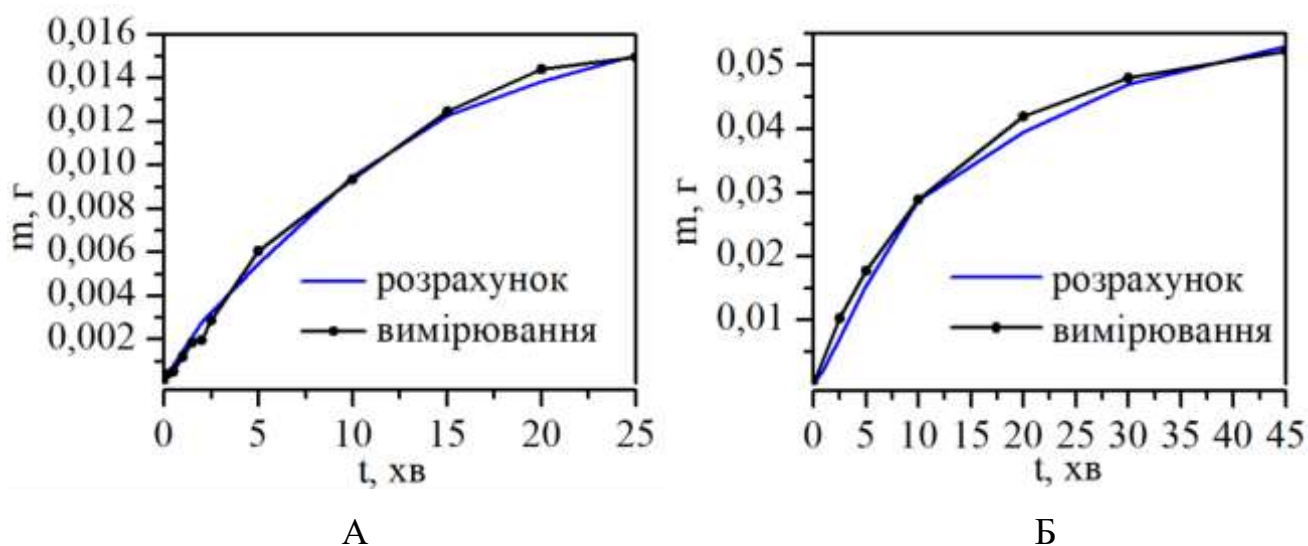


Рис. 3.11 Залежність маси m залізних (А) та платинових (Б) наночастинок у воді від часу абляції t .

На графіках (Рис. 3.11) вказані значення маси наночастинок, яку обчислено за даними імпедансу вимірювальної комірки (calculated mass), маси наночастинок, яку виміряно прямим методом (measured mass).

Маса частинок m у суспензії обчислюється за емпіричною формулою:

$$m = k \left(\frac{1}{Z} - \frac{1}{Z_{pure}} \right), \quad (3.3)$$

де Z_{pure} – модуль імпедансу вимірювальної комірки, що містить чистий розчинник, Z – значення модуля імпедансу вимірювальної комірки, що містить суспензію, k – емпіричний коефіцієнт. Даний коефіцієнт визначається експериментально для окремого типу суспензії та геометрії комірки.

На наступному етапі досліджень проведено дослідження електропровідності суспензії наночастинок заліза в залежності від розподілу наночастинок в просторі, що на макрорівні відображається як стабільність суспензії. Водні суспензії наночастинок металів зазвичай є нестабільними. Наночастинки агрегують та випадають в осад, і лише незначна їх частина утримується розчинником у стані седиментаційної рівноваги. Спричинити більш рівномірний розподіл наночастинок можна, наприклад, ультразвуковим диспергуванням. З часом через процес агрегації знов утворюється осад.

Якщо у міжелектродному просторі вимірювальної комірки присутня велика кількість агрегатів, наприклад, після простого збовтування, то імпеданс комірки зростає. Даний експеримент було проведено з частинками заліза. На Рис. 3.12 представлено характер поведінки імпедансу суспензії для двох типів перемішування: ультразвукове диспергування та просте збовтування. Методом ультразвукової диспергації наночастинки переводяться у стан седиментаційної рівноваги, який з часом порушується внаслідок агрегації наночастинок.

Як видно з Рис. 3.12, з часом імпеданс встановлюється на рівні, який відповідає стану седиментаційної рівноваги.

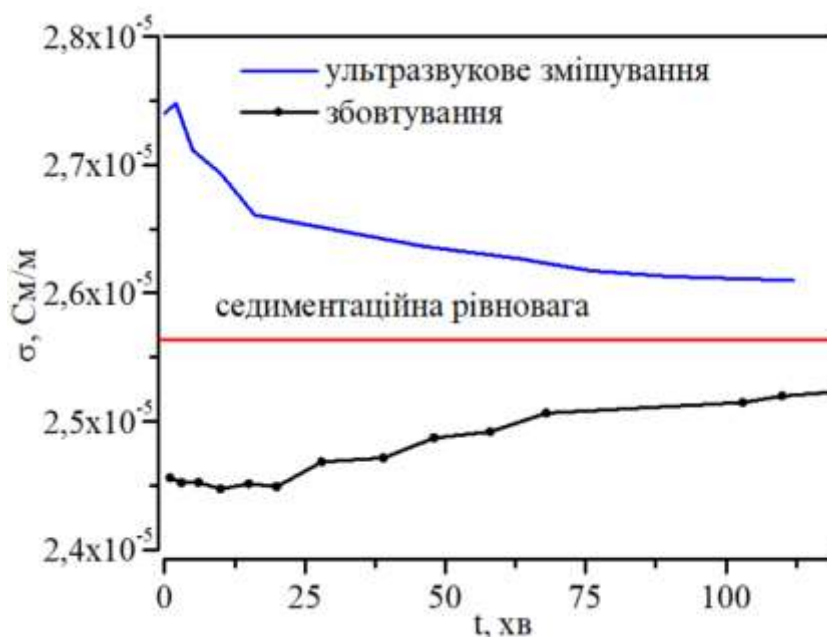


Рис. 3.12. Змінення електропровідності суспензії наночастинок заліза з часом при осадженні наночастинок після перемішування та після ультразвукової обробки.

Для вирішення задач фізичної хімії по створенню нових експрес-методів якісного та кількісного аналізу розчинів, біологічних рідин і суспензій проведено моделювання імпедансу вимірювальної комірки, що містить водну суспензію наночастинок металів. Показано, що формула змішування Бругтемана у випадку композиції метал-діелектрик є асимптотичним наближення при наближенні розмірів металевих включень до нуля. Проведено дослідження впливу розподілу металевих включень у об'ємі вимірювальної комірки на її імпеданс. Показано, що на основі даних імпедансу можна визначити розмір включень при постійній концентрації або концентрацію при постійному розмірі наночастинок.

Запропоновано простий метод синтезу наночастинок заліза в магнетитовій оболонці, заснований на реакції контрольованого окислення заліза озоном.

Удосконалено технологічний процес отримання наночастинок металів методом лазерної абляції. Метод імпедансної спектроскопії використано у якості непрямого методу реального часу для вимірювання масової частки металу у суспензії. Представлено просту емпіричну формулу для обчислення маси металу у суспензії за даними модуля імпедансу електрохімічної комірки.

За даними імпедансу суспензії вдалось оцінити її стабільність. Встановлено, що стану седиментаційної рівноваги суспензії відповідає конкретне значення імпедансу. У випадку перенасиченого розчину імпеданс суспензії суттєво зменшується.

Проведені дослідження знаходяться на межі різних наукових напрямків, але є актуальними у різних галузях науки і техніки, зокрема, у біотехнологіях та біомедицині. Показано, що метод імпедансної спектроскопії є непрямим методом для оцінки якісних і кількісних фізико-хімічних параметрів розчинів та суспензій.

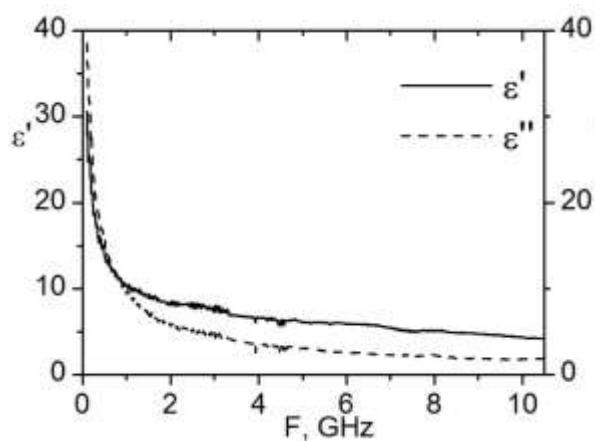
3.2 Дослідження електрофізичних характеристик біологічних тканин на прикладі м'язової, з'єднувальної тканин та шкіри

3.2.1 Дослідження електропровідності та діелектричної проникності м'язової, з'єднувальної тканин та шкіри

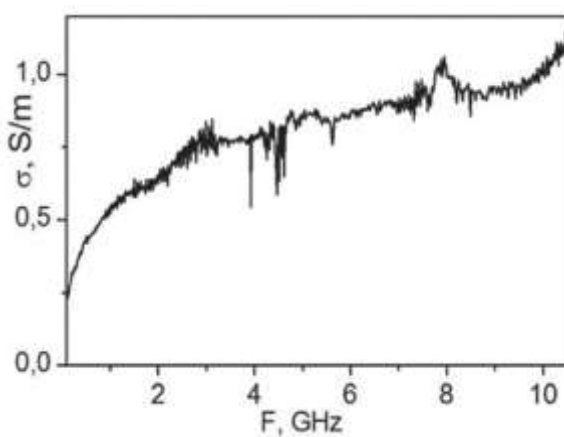
Для дослідження зв'язку електрофізичних параметрів з характеристиками протікання фізіологічних процесів в біологічних об'єктах було досліджено електропровідність та діелектричну проникність м'язової, з'єднувальної тканин та шкіри (Рис. 3.13).

Використовувався розроблений в рамках роботи [15] вимірювальний сенсор на коаксіальному зонді, який являє собою відкритий кінець коаксіального хвилеводу, що дозволяє проводити вимірювання електрофізичних параметрів (зокрема, електропровідності і діелектричної проникності) як твердих, так і рідких середовищ.

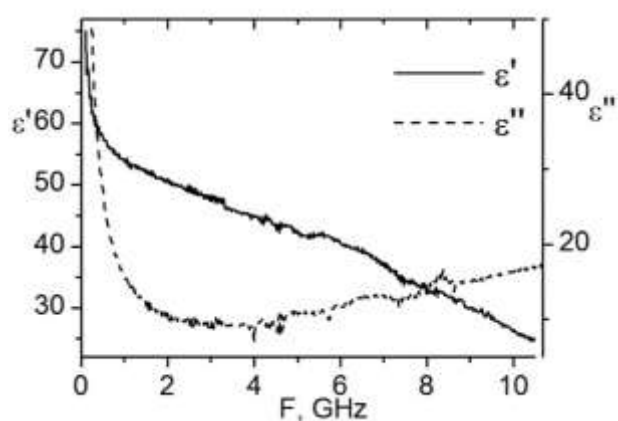
Векторний аналізатор електричних кіл дозволяє безпосередньо вимірювати дійсну і уявну частини коефіцієнта відбиття сигналу від зонда, навантаженням якого було досліджуване середовище. За виміряними значеннями дійсної та уявної частини коефіцієнта відбиття здійснювали розрахунок параметрів середовища за алгоритмом, розробленим на основі еквівалентної схеми вимірювального кола.



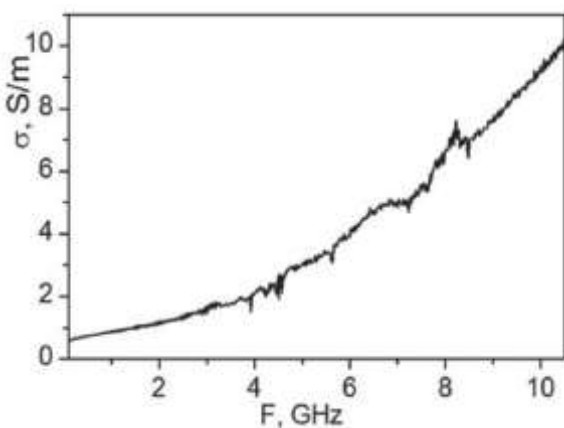
А



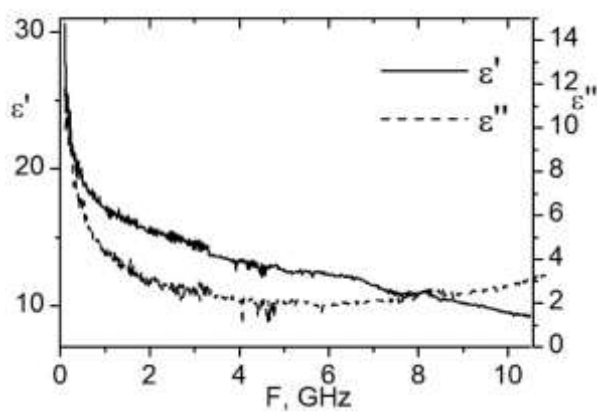
Б



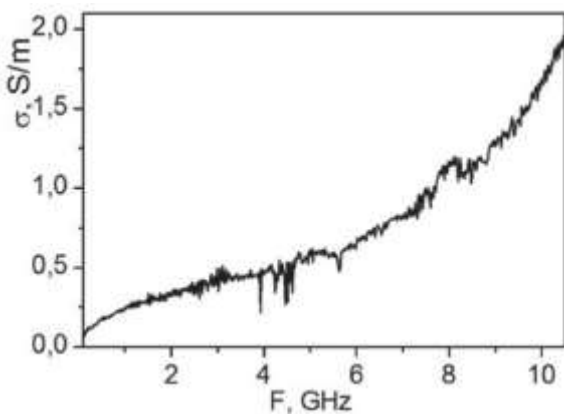
В



Г



Д



Е

Рис. 3.13 Частотні залежності відповідно дійсної та уявної частини діелектричної проникності А та питомої електропровідності Б з'єднувальної тканини на прикладі жирової; В, Г – відповідно те саме для м'язової тканини; Д, Е – відповідно те саме для шкіри.

Отримані дисперсійні криві дійсної і уявної частин діелектричної проникності в діапазоні частот 0,1–10,5 ГГц для трьох зразків біологічних тканин (м'язової тканини, з'єднувальної тканини на прикладі жирової і шкіри). На рис. 3.14 представлені частотні залежності модуля діелектричної проникності досліджуваних речовин.

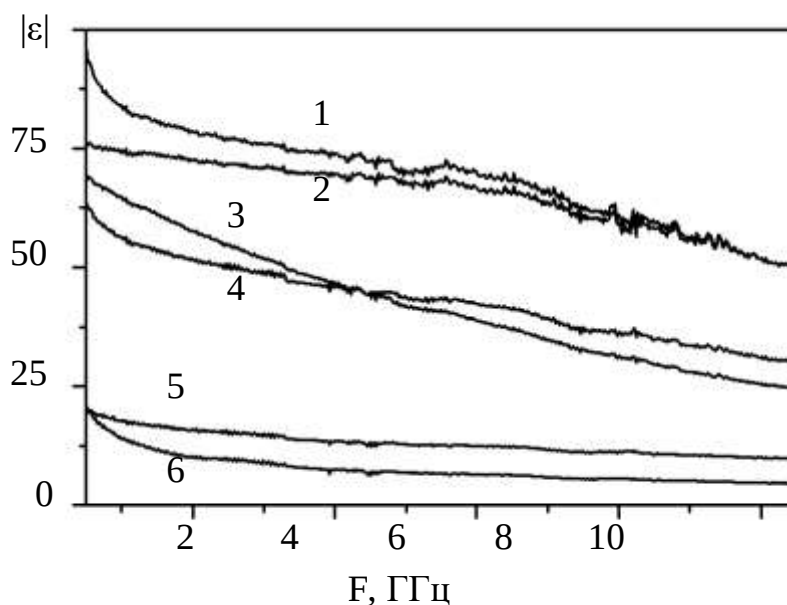


Рис. 3.14 Частотні залежності модуля діелектричної проникності: 1 – фізіологічний розчин, 2 – вода, 3 – розчин глюкози, 4 – м'язова тканина, 5 – шкіра людини, 6 – з'єднувальна тканина.

Жирова тканина має виражені діелектричні властивості з діелектричною проникністю порядку десятків і малою питомою електропровідністю, що експериментально підтверджується результатами вимірювань (Рис. 3.13 Б). Епітеліальна тканина (шкіра) має меншу електропровідність у порівнянні з жировою тканиною (Рис. 3.13 Б, Е), оскільки містить роговий шар, який не має живих клітин, і діелектричну проникність, порівняну з такою жирової тканини (Рис. 3.13 А, Д). М'язова тканина має більшу електропровідність порівняно з жировою тканиною (Рис. 3.13 Б, Г), тому що містить більше води (близько 72 – 80 %), діелектрична проникність якої дорівнює 81, що також впливає на значення діелектричної проникності (Рис. 3.13 В).

Отримані результати показали, що електропровідність різних тканин відображає їх інтегральні характеристики і потенційно може бути використана для оцінки функціональних і структурних особливостей багатокомпонентних біологічних середовищ. Однак на даному рівні досліджень зв'язку електропровідності біологічних об'єктів з фізіологічними процесами в цих об'єктах біологічні тканини є занадто складним об'єктом дослідження. Тому наразі є перспективними дослідження вказаних зв'язків на більш простих моделях, таких як суспензії клітин або біологічні рідини та їх компоненти.

Отримані значення діелектричних параметрів можуть мати прикладне значення в дослідженні поширення ЕМП в тканинах, наприклад, в системах радіотермометрії.

3.2.2 Модель розповсюдження власного теплового електромагнітного випромінювання від теплових аномалій в біологічних тканин на основі отриманих значень електрофізичних параметрів біологічних тканин

В існуючих моделях розподілу температурних полів в біологічних об'єктах передбачається наявність джерела підвищеного тепловиділення (локальне запалення, онкологічне новоутворення [122]). Температурні поля в зоні більш низької температури вивчені недостатньо. Це можливо, якщо в глибинних шарах тканин знаходиться ділянка з порушенням кровообігу і уповільненими процесами метаболізму, які не супроводжуються запаленням. Пропонується розробити модель визначення глибинної температури біологічної тканини у випадку наявності від'ємної температурної аномалії.

3.2.2.1 Математична модель розподілу температури в біологічній тканині на двокомпонентній моделі

Для побудови моделі розподілу температури при наявності джерела зі зниженою температурою приймемо такі припущення [20]:

- уражена ділянка є однорідною сферою радіусом r_0 , розташовану на відстані $a > r_0$ від поверхні шкіри;
- тепловиділення в сфері дуже мале в порівнянні з тепловиділенням здорових тканин, що оточують сферу;
- теплопровідність всередині сфери менша за теплопровідність навколишніх тканин внаслідок зменшення кровотоку в ураженій ділянці.

Точне вирішення задачі про перенесення і розподіл тепла в середовищі можна отримати, скориставшись методами математичної фізики. У цьому випадку рішення рівняння теплопровідності зводиться до вирішення задачі Коші і дозволяє з великим ступенем точності визначити функцію розподілу тепла в середовищі. У разі біологічної тканини це вкрай складно з кількох причин. По-перше, середовище не є однорідним, з точки зору теплових властивостей. По-друге, функцію джерела не можна визначити однозначно. Крім того, процес формування джерела підвищеної температури (онкологічного новоутворення) носить індивідуальний характер.

Для наближених оцінок теплових полів немає необхідності в точних розрахунках. Тому розглянемо задачу на прикладі розподілу електростатичного поля, скориставшись аналогією між електростатичним (потенційним) і тепловим полями. При моделюванні теплових процесів електростатичними діелектрична проникність ε відповідає коефіцієнту теплопровідності κ , а густина заряду ρ – питомій тепловиділення ρ_T . Електростатична модель являє собою діелектричну кулю з радіусом r_0 і з діелектричною постійною ε_1 , що знаходиться в середовищі з діелектричною постійною ε_2 .

Питоме тепловиділення в сфері, як зазначено вище, дуже мале в порівнянні з питомим тепловиділенням навколишньої тканини. Відповідно, в рамках електростатичної моделі розглянута ділянка буде являти собою область з нульовим зарядом в середовищі з густиною позитивного заряду ρ . За принципом суперпозиції електричного поля, електричний потенціал поля N джерел дорівнює сумі потенціалів поля кожного джерела:

$$\varphi = \sum_N \varphi_i. \quad (3.4)$$

Умовно помістимо в кожную точку біологічної тканини фіктивний негативний заряд з густиною ρ . Скориставшись принципом суперпозиції електричного поля і порахувавши сумарний заряд в кожній точці, отримаємо модель. Ця модель приведена до наступного вигляду: заряджений діелектричний шар з розподіленим негативним зарядом з густиною ρ в незарядженому діелектричному середовищі. Оскільки тепловиділення неушкодженої тканини прийнято за нульовий рівень, рішенням такого завдання буде не абсолютне значення температури, а зміна температури відносно нормальної температури здорової тканини ΔT , викликана аномалією.

Сумарний заряд кулі дорівнює:

$$q = \rho V = \frac{4}{3} \pi \rho r_0^3. \quad (3.5)$$

Вирішивши задачу електростатики для зарядженої кулі в однорідному просторі, отримуємо потенціал φ в точці на відстані r від центру кулі:

$$\varphi(r) = \frac{\rho r_0^2}{3\varepsilon_2} + \frac{\rho}{6\varepsilon_1} \cdot (r_0^2 - r^2) \quad \text{для } 0 \leq r \leq r_0, \quad (3.6)$$

$$\varphi(r) = \frac{\rho r_0^3}{2\varepsilon_2 r} \quad \text{для } r \geq r_0. \quad (3.7)$$

У разі, коли температурна аномалія розташована поблизу поверхні тіла на відстані a , порівнянній з радіусом аномалії, на розподіл температури впливають теплофізичні параметри шкіри. Температурна аномалія розташована всередині біологічної тканини з високою теплопровідністю поблизу плоскої межі з повітрям, який має низьку теплопровідність. В електростатичній моделі формулюємо задачу розподілу поля заряду, розташованого поблизу плоскої межі розділу двох середовищ з діелектричної проникністю відповідно ε_2 і $\varepsilon_3 < \varepsilon_2$. Заряд рівномірно розподілений всередині діелектричного кулі з діелектричної проникністю ε_1 і радіусом r_0 .

Потенціал в довільній точці P простору залежить від відстані між точкою P і центром зарядженої кулі і відстані від точки P до площини розділу середовищ. Вплив межі розділу середовищ врахуємо, застосувавши метод зображень [123].

Помістимо симетрично центру заряду відносно площини розділу, тобто в точку $(-a; 0; 0)$, заряд $Q' = Q$ (Рис. 3.15).

Рішенням задачі є розподіл потенціалів тільки в півпросторі $x > 0$. Потенціал в довільній точці цього півпростору дорівнює сумі потенціалів зарядженої сфери φ_1 і фіктивного симетричного заряду φ'_1 :

$$\varphi = \varphi_1 + \varphi'_1. \quad (3.8)$$

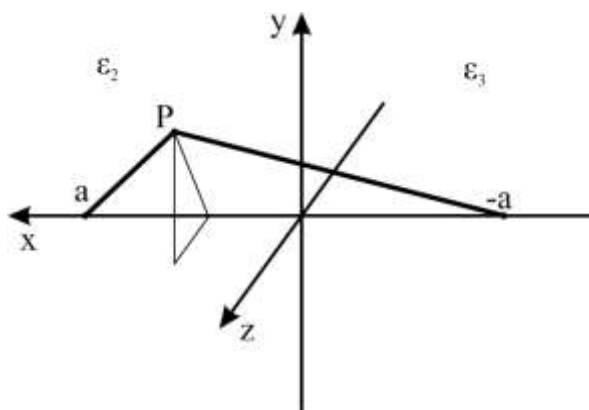


Рис. 3.15 Електричне поле в точці P , створене двома зарядами, розташованими в точках $(a; 0; 0)$ і $(-a; 0; 0)$ (x, y, z – просторові координати).

Потенціал φ_1 розраховується за формулами (3.6), (3.7). Відстань від центру кулі r дорівнює:

$$r = \sqrt{(x - a)^2 + y^2 + z^2}. \quad (3.9)$$

Потенціал φ'_1 дорівнює:

$$\varphi'_1 = \frac{\lambda Q}{\varepsilon_2 r'}, \quad (3.10)$$

де $\lambda = \frac{\varepsilon_2 - \varepsilon_3}{\varepsilon_2 + \varepsilon_3}$, виходячи з умов безперервності електричного поля на межі розділу [123]. Відстань від центру фіктивного заряду r' дорівнює:

$$r' = \sqrt{(x + a)^2 + y^2 + z^2}. \quad (3.11)$$

Підставивши (3.6), (3.7), (3.10) в (3.8), отримаємо розподіл потенціалів:

$$\varphi(x, y, z) = \begin{cases} \frac{\rho}{6\varepsilon_1} \cdot (r_0^2 - r^2) + \frac{r_0^2 \rho}{3\varepsilon_2} \cdot \left(1 + \frac{\varepsilon_2 - \varepsilon_3}{\varepsilon_2 + \varepsilon_3} \cdot \frac{r_0}{r'}\right), & 0 \leq r \leq r_0 \\ \frac{r_0^3 \rho}{3\varepsilon_2} \left(\frac{1}{r} + \frac{\varepsilon_2 - \varepsilon_3}{\varepsilon_2 + \varepsilon_3} \cdot \frac{1}{r'}\right), & r \geq r_0 \end{cases} \quad (3.12)$$

Перейшовши від електростатичних параметрів до теплофізичних, отримуємо наступний розподіл температури:

$$T(x, y, z) = \begin{cases} \frac{\rho_T}{6\kappa_1} \cdot (r_0^2 - r^2) + \frac{r_0^2 \rho_T}{3\kappa_2} \cdot \left(1 + \frac{\kappa_2 - \kappa_3}{\kappa_2 + \kappa_3} \cdot \frac{r_0}{r'}\right), & 0 \leq r \leq r_0 \\ \frac{r_0^3 \rho_T}{3\kappa_2} \left(\frac{1}{r} + \frac{\kappa_2 - \kappa_3}{\kappa_2 + \kappa_3} \cdot \frac{1}{r'}\right), & r \geq r_0 \end{cases} \quad (3.13)$$

Отриманий розподіл представлено на Рис. 3.16. Отримані результати відповідають результатам дослідження температурних полів за допомогою інфрачервоних тепловізорів для випадку двовірної моделі [124, 125].

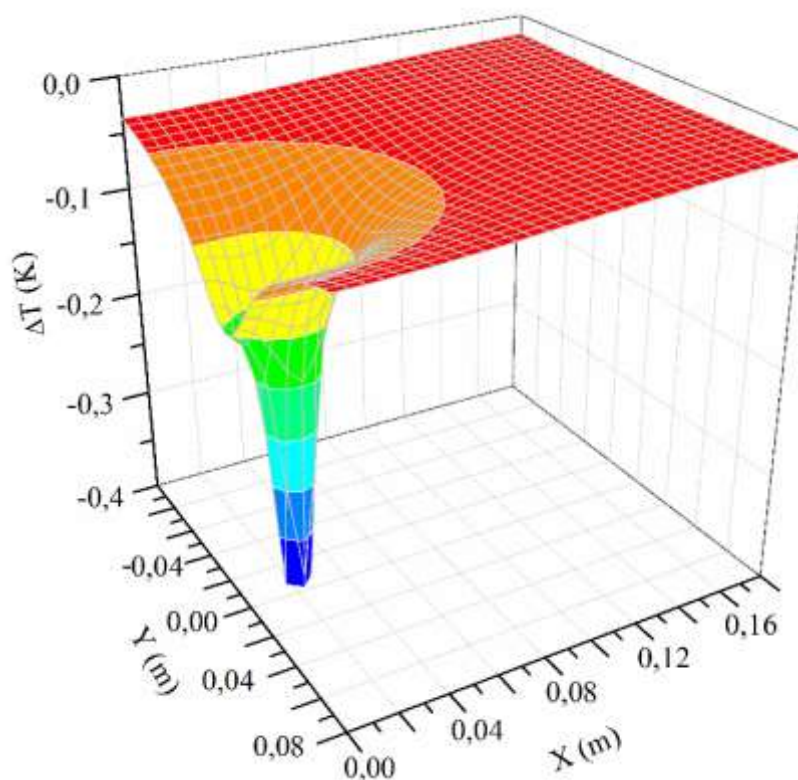


Рис. 3.16 Розподіл відхилення температури ΔT всередині біологічної тканини при $a = 2,5$ см (x – вісь, спрямована перпендикулярно шкірі, y – вісь, спрямована уздовж шкіри).

Як бачимо, межа біологічного середовища вносить вклад в формування температурного поля, і на поверхні шкіри виникає теплова пляма. При невеликих глибинах залягання температурної аномалії температурна пляма добре помітна (Рис. 3.17 А) і може бути досліджено методами інфрачервоної термометрії. Моделювання температурної плями на поверхні шкіри при різних розмірах і глибинах залягання температурної аномалії дозволило визначити граничну глибину залягання температурної аномалії.

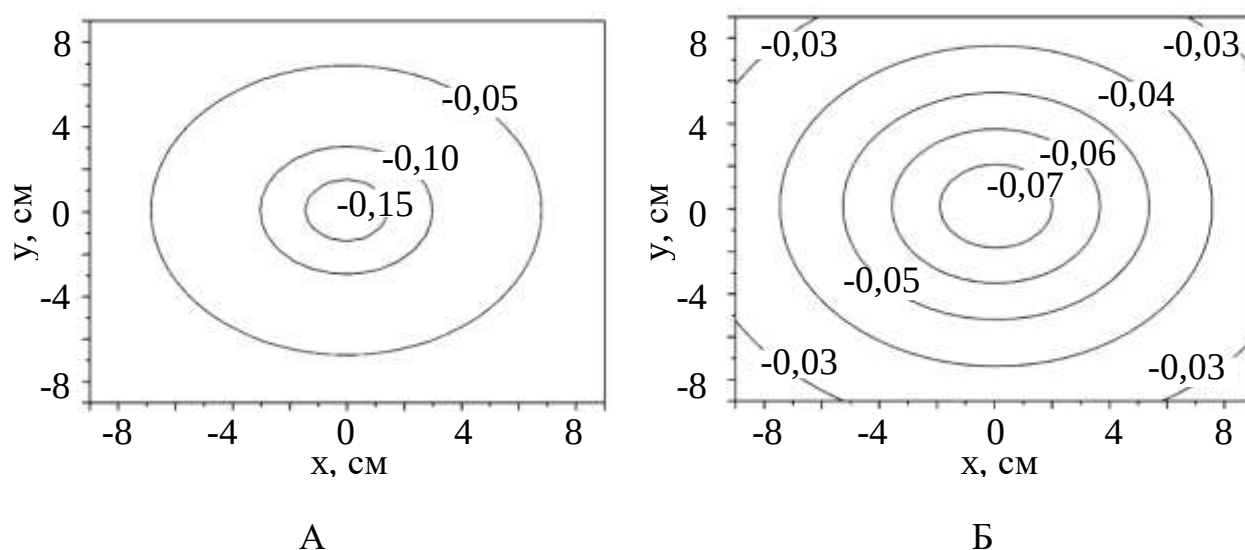


Рис. 3.17 Температурна пляма на поверхні шкіри (y, z – просторові координати на поверхні шкіри) при $a = 2$ см (А) і при $a = 5$ см (Б).

Ця умова виконується при розташуванні температурної аномалії на глибині до 2 – 3 см в залежності від параметрів біологічного середовища і параметрів температурної аномалії, що визначає вибір робочих частот радіометра.

При більшій глибині залягання (Рис. 3.17 Б, Рис. 3.18) температурна пляма стає мало помітною за допомогою інфрачервоного тепловізора [125].

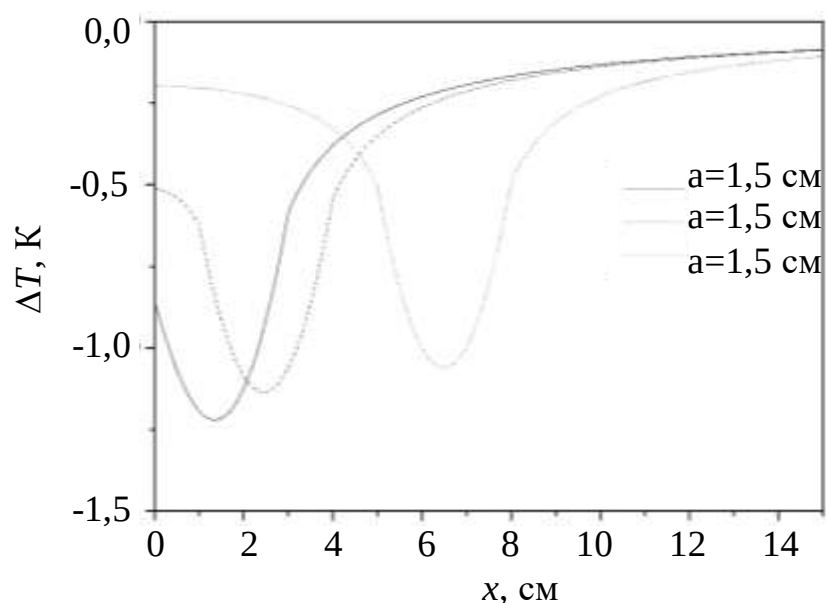


Рис. 3.18 Розподіл відхилення температури ΔT по глибині x в площині, що перпендикулярна поверхні шкіри і проходить через центр температурної аномалії, при різних глибинах залягання аномалії.

Тому, при збільшенні глибини залягання джерела температурної аномалії, основним методом дослідження стає СВЧ радіотермометрія.

Із Рис. 3.18 видно, як зі зміною глибини залягання змінюється вплив температурної аномалії на температуру поверхні шкіри ($x = 0$). Очікувано максимальний вплив на температуру поверхні надають неглибоко розташовані області аномальної температури.

3.2.2.2 Математична модель визначення глибинної температури за власним електромагнітним випромінюванням

Потужність електромагнітного випромінювання будь-якої точки речовини, що має ненульову температуру, розташованої на глибині x , пропорційно температурі. Поширюючись всередині шару тканини товщиною x , випромінювання експоненціально загасає [126] і потужність випромінювання на поверхні дорівнює:

$$P(x) = P_0 e^{-\frac{x}{l}}, \quad (3.14)$$

де l – товщина шару тканини, в якому потужність випромінювання зменшується в e разів.

Потужність, що виділяється в елементі довжини dx , дорівнює:

$$dP = -\frac{1}{l} P_0 e^{-\frac{x}{l}} dx \quad (3.15)$$

Потужність випромінювання, обумовленого температурою біологічної тканини, прямо пропорційна температурі. Тому потужність випромінювання однозначно визначається шумовою температурою $T_{ш}$. Інтегруючи (3.15), отримуємо вираз для загального випадку розподілу температури всередині об'єкта:

$$T_{ш} = \frac{1}{l} \int_0^{\infty} T(x) e^{-\frac{x}{l}} dx \quad (3.16)$$

Існуючі рішення задачі визначення глибинних температур [122, 126, 127] використовують різні моделі розподілу температур $T(x)$, що відповідають реальному розподілу з необхідним ступенем точності.

В роботі [122] показано, що використання моделі прямокутного розподілу температур дозволяє зв'язати наявність області підвищеної температури з результатами радіометричних вимірювань. В [127] застосована модель гаусового розподілу температур, що дозволило більш точно локалізувати температурну аномалію.

Виміряна за допомогою радіометра температура $T_{ш}$ є функцією трьох змінних: глибини залягання температурної аномалії, її температури і розмірів (у разі сферичної моделі – радіуса). Радіус температурної аномалії можна привести в залежність від пікового значення її температури, в такому випадку $T_{ш}$ є функцією двох незалежних змінних. Таким чином, за допомогою одного рівняння достовірно не можна точно локалізувати температурну аномалію і визначити її температуру, не вдаючись до припущення фіксованою глибини залягання, і це є недоліком методу. Зазначена проблема обмежує практичне застосування радіотермометрії в діагностиці. Оскільки можливо тільки якісне визначення наявності аномалії без точних кількісних характеристик, метод найбільш широко застосовний для діагностики раку молочної залози [128-130]. Молочна залоза з точки зору електрофізичних властивостей є однорідним середовищем. Будучи парним

симетричним органом, вона дає можливість якісного виявлення температурної аномалії по відмінностям показників, отриманих для двох залоз.

Можливим шляхом визначення двох змінних (розміру температурної аномалії і глибини її залягання) є проведення вимірювань на різних частотах. Вимірювання на кожній частоті додає додаткове рівняння в систему рівнянь, що дозволить обчислити необхідну кількість незалежних змінних [127]. Розглянемо можливості багаточастотної радіотермометрії для даної моделі розподілу температури в біологічному середовищі $T(x, y, z)$ при наявності температурних аномалій (3.13).

Обчислимо шумову температуру на поверхні шкіри за формулою (3.16) в точці безпосередньо над центром температурної аномалії, тобто використовуємо формулу для $T(x, y, z)$ при $y = z = 0$. У формулі будемо вважати невідомими змінними глибину залягання температурної аномалії a і її радіус r_0 .

Глибина проникнення випромінювання в біологічні тканини l приблизно дорівнює довжині хвилі випромінювання в біологічній тканині, тобто залежить від частоти випромінювання і діелектричної проникності середовища, яка в загальному випадку також залежить від частоти [15]:

$$l(f) = \frac{c}{f \cdot \sqrt{\varepsilon(f)}}. \quad (3.17)$$

Отримуємо вираз для шумової температури на поверхні шкіри, яка залежить від глибини залягання і радіусу температурної аномалії, а також частоти, на якій проводиться вимірювання:

$$T_{\text{ш}}(a, r_0, f) = \frac{1}{l(f)} \int_0^\infty T(x, a, r_0) e^{-\frac{x}{l(f)}} dx. \quad (3.18)$$

Таким чином, щоб знайти два невідомих a і r_0 , необхідна система двох рівнянь [131]. Для отримання системи рівнянь необхідно провести вимірювання шумової температури на поверхні шкіри на двох частотах:

$$\begin{cases} T_{\text{ш}}(a, r_0, f_1) = T_1 \\ T_{\text{ш}}(a, r_0, f_2) = T_2 \end{cases}. \quad (3.19)$$

У середовищі Mathcad були проведені розрахунки для двох різних частот. Вибір частоти обґрунтований залежністю глибини проникнення електромагнітного

випромінювання в біологічній тканині. Оскільки температурна аномалія, що розташована на глибині менше 2 см, може бути досліджена методом інфрачервоної термографії, для радіотермометрії повинна виконуватися умова:

$$\frac{c}{f \cdot \sqrt{\varepsilon(f)}} \geq 2 \text{ см.} \quad (3.20)$$

Вирішивши нерівність (3.20) для жирової тканини, отримаємо, що частота радіометра повинна задовольняти умові $f \leq 2,8$ ГГц. Для м'язової тканини, з підвищеним вмістом води і високою діелектричної проникністю, $f \leq 1,8$ ГГц. Доцільно вибирати частоту ще менше, не переходячи до граничних випадків.

Було проведено розрахунки модельного випадку, коли фіксується шумова температура 0,18 К на частоті $f_1 = 1$ ГГц і шумова температура 0,175 К на частоті $f_2 = 0,8$ ГГц. Розрахована за вхідними даними глибина залягання становила 6,2 см, радіус аномалії дорівнює 1,2 см.

Технічна реалізація методу двочастотної радіотермометрії є окремим завданням [132, 133]. Проблемою є розробка широкосмугової антени, узгодженої з біологічним об'єктом на різних частотах, або синхронізація і узгодження декількох антен, що застосовуються для одночасних вимірювань на різних частотах.

3.3 Дослідження характеристик клітин кісткового мозку в первинній культурі у тварин різного віку з Cu-індукованим фіброзом печінки

Одними з найпоширеніших негативно діючих на організм факторів середовища є іони важких металів і зокрема іони міді [134]. Відомо, що іони міді при попаданні в організм здатні приводити до прояву окисного стресу, а при хронічному впливі – індукувати фіброз печінки [100]. У зв'язку з цим, представляє інтерес дослідження змін, що відображаються на клітинах кісткового мозку, та їх зв'язок з біофізичними показниками, що підлягають інструментальному вимірюванню.

3.3.1 Дослідження характеристик клітин кісткового мозку молодих та старих інтактних тварин (характеристика «вихідного» рівня)

Кількісний (Рис. 3.19 А) і якісний склад клітин кісткового мозку (ККМ), тобто спрямованість диференціювання мезенхімальних стовбурових клітин відображає потреби оточення, тобто завжди є адаптивною системною відповіддю організму.

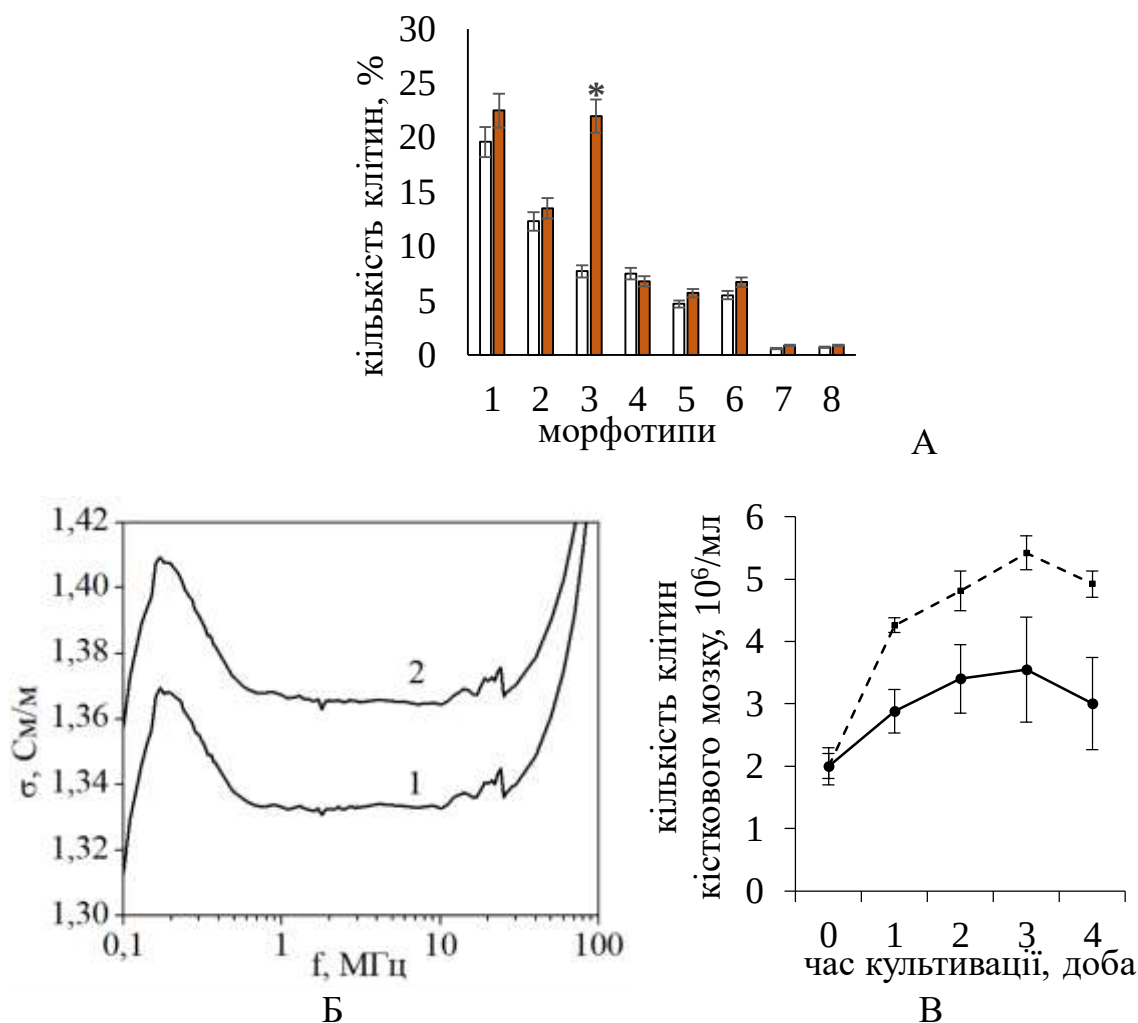


Рис. 3.19 А – Кількість морфологічно ідентифікованих клітин кісткового мозку, на осі ординат морфотипи клітин (1 – паличкоядерні нейтрофіли; 2 – метамієлоцити; 3 – лімфоцити; 4 – сегментоядерні нейтрофіли; 5 – мієлоцити; 6 – еозинофіли; 7 – базофіли; 8 – моноцити), отриманих у молодих (□) і старих (■) тварин. Б – питома електропровідність суспензій клітин кісткового мозку, отриманих у інтактних молодих (1) і старих (2) тварин в діапазоні частот f від 100 кГц до 100 МГц. В – Проліферативна активність клітин кісткового мозку в первинній культурі, які виділені у молодих (—■—) і старих (---■---) інтактних тварин.

З'ясувалося, що морфологічні типи ККМ молодих і старих тварин представлені в однаковій кількості, за винятком лімфоцитів, яких було в 2,8 рази більше у старих тварин, ніж у молодих (Рис. 3.19 А).

Оскільки молоді і старі тварини від народження і до початку експерименту містилися в однакових стандартних умовах, то збільшення вмісту лімфоцитів у старих тварин може вказувати на те, що вони піддалися невідомому (неврахованому) фактору середовища, який призвів до збільшення кількості імунокомпетентних клітин. Можна очікувати, що у старих тварин змінено мікрооточення ККМ, що і призвело до «корекції» спрямованості диференціювання ККМ. З метою характеристик мікрооточення ККМ визначали деякі показники редокс-системи організму у молодих і старих тварин.

Виявилося, що в сироватці крові старих тварин містилося на 34% менше, всупереч очікуванням, гідропероксидів ліпідів в порівнянні з молодими тваринами (Табл. 3.2). Менша кількість продуктів вільнорадикальних реакцій в організмі старих тварин може бути пов'язано з більшою активністю антиоксидантних ферментів. Виявили, що активність глутатіонпероксидази, одного з ключових ферментів антиоксидантної системи захисту в сироватці крові старих тварин, було на 65% вище за таку молодих (Табл. 3.2). Вміст в сироватці крові церулоплазміну, який має поліфункціональні властивості, в тому числі і антиоксидантну активність, було на 60% більше, ніж у молодих тварин (Табл. 3.2).

Таблиця 3.2

Вміст гідропероксидів ліпідів (LHP), церулоплазміну (CPL) і активність глутатіонпероксидази (GP), співвідношення GP / LHP в сироватці крові молодих (3 міс) і старих (20 міс) інтактних щурів лінії *Wistar*. * відмічені варіанти, для яких $p \leq 0,05$ в порівнянні з молодими тваринами, по тесту Манна – Уїтні.

Індикатори	Вік тварин	
	Молоді	Старі
LHP	$4,4 \pm 0,36$	$2,9 \pm 0,51^*$
CPL	$1,2 \pm 0,08$	$2,0 \pm 0,18^*$
GP	$3587,4 \pm 258,4$	$5925,6 \pm 423,3^*$
GP/LHP	$8,1 \pm 10^2$	$20,2 \pm 10^{2*}$

Отже, у старих тварин, показники редокс-системи організму зміщені в бік антиоксидантів, в той час як у молодих тварин рівновагу редокс-системи зміщено в бік прооксидантів. На користь цього свідчить і співвідношення активності глутатіонпероксидази до загальної кількості гідропероксидів ліпідів. Так, ГП / ГПЛ у старих тварин в 2,5 рази вище, ніж у молодих (Табл. 3.2).

З метою визначення взаємозв'язку редокс-системи організму з редокс-системою ККМ, було визначено вміст ROS в ККМ. Дійсно, мікрооточення ККМ старих тварин, яке формується всіма системами організму, відрізнялося від такого молодих тварин.

Клітини кісткового мозку, отримані у старих (20-ти міс.) щурів містили на 73% більше кальцію в порівнянні з ККМ, отриманими у молодих (3-х міс.) щурів (Табл. 3.3). У той же час, ККМ старих інтактних тварин містили в 5 разів менше іонів міді в порівнянні з ККМ молодих тварин (Табл. 3.3).

Таблиця 3.3

Вміст іонів міді, іонів кальцію, ROS в клітинах кісткового мозку молодих і старих інтактних тварин та молодих і старих тварин з Cu-індукованим фіброзом печінки. * відмічені варіанти, для яких $p \leq 0,05$ в порівнянні з молодими тваринами, по тесту Манна – Уїтні.

Досліджуваний параметр	Молоді тварини		Старі тварини	
	інтактні тварини	тварини з Cu-індукованим фіброзом печінки	інтактні тварини	тварини з Cu-індукованим фіброзом печінки
Cu^{2+} (мкг/ 10^6 клітин)	$0,072 \pm 0,005$	$0,107 \pm 0,005$	$0,013^* \pm 0,002$	$0,044^* \pm 0,009$
Ca^{2+} (ум. од.)	$167 \pm 4,9$	$96 \pm 3,8$	$230^* \pm 8,1$	$297^* \pm 7,7$
ROS (ум. од.)	$374 \pm 7,6$	$272 \pm 3,6$	$148^* \pm 5,3$	$159^* \pm 6,2$

Як відомо, іонний склад клітини регулюється різними механізмами [135] і, як виявляється, впливає на функціональну активність клітин. Іони металів входять до складу великої кількості ферментів і регулюють їх активність [136], забезпечують

внутрішньоклітинний сигналінг [137], регулюють внутрішньоклітинний транспорт, впливають на характеристики редокс-системи клітини.

Виявилося, що вміст ROS в ККМ старих тварин був в 2,5 рази менше, ніж в ККМ молодих тварин (Табл. 3.3). Отже, між показниками прооксидантно-антиоксидантної системи організму і клітинами печінки існує добре виражений взаємозв'язок, що вказує на роль мікрооточення, яке формується в організмі, на показники ККМ. Визначити іонний склад клітин, з одного боку, завдання не просте, а з іншого боку, знання сумарного вмісту іонів не дає розуміння про інтегральні механізми їх впливів в клітині. У зв'язку з цим, використовували визначення електропровідності в суспензії клітин, що відображає кількість рухливих іонів в клітині.

Питома електропровідність суспензії клітин кісткового мозку, отриманих у старих тварин, була достовірно вище такої молодих тварин (Рис. 3.19 Б).

З огляду на те, що в суспензії клітин кісткового мозку молодих і старих тварин містилася однакова кількість клітин (3 млн / мл), то можна стверджувати, що кількість рухомих іонів в клітинах старих тварин може бути більше, в порівнянні з молодими. Разом з тим, не можна виключати, що в забезпеченні електропровідності клітинних суспензій беруть участь не тільки іони, а й інші заряджені компоненти клітин. Є дані, що в біологічних середовищах можуть формуватися клітинні струмопровідні структури [138]. Ці результати можуть вказувати на структурно-функціональні відмінності ККМ молодих і старих тварин, які відображають функціональну потребу організму.

Отже, ККМ, що утворюються у старих тварин, відрізняються від молодих тварин за показниками редокс-системи та іонного складу, фізико-хімічними характеристиками і ймовірно за функціональними особливостями. Як відомо, важливою інтегральною характеристикою функціональних характеристик клітин є їх здатність до проліферації.

Проліферативна активність ККМ, отриманих у старих тварин, була на 47% вище в порівнянні з такою молодих тварин через добу після переведення клітин в культуру (Рис. 3.19 В). На другу і третю добу інтенсивність росту культури

сповільнювалася і виходила на стаціонарний рівень для ККМ як молодих, так і старих тварин (Рис. 3.19 В).

Прояв проліферативної активності ККМ в культурі відображає перш за все розподіл лімфоцитів. Однак, кількість лімфоцитів у старих тварин було збільшено в 2,8 рази, а проліферативна активність у них перевершувала таку у молодих тільки на 47%.

Отримані результати можуть вказувати на те, що в процесі адаптаціогенезу (старіння) при стандартних фізіологічних умовах (відсутність екстремальних впливів) в організмі формуються специфічні взаємовідношення в ієрархічній мережі регуляції (іонний склад, редокс-система, метаболічні патерни, фізіологічні ознаки), які спрямовані на збереження принципу оптимальності в конкретних умовах. Можна припустити, що такі взаємовідношення, які не є «жорсткими», можуть імпринтуватися, що призведе до модифікації подальшої адаптивної відповіді на новий адаптивний сигнал.

З метою перевірки такої можливої модифікації адаптивної відповіді провели серію експериментів по оцінці експериментального впливу індукованого фіброзу печінки на тварин різного віку.

При обґрунтуванні схеми експерименту виходили з того, що печінка відіграє важливу роль в метаболічній регуляції організму і зокрема в формуванні мікрооточення ККМ, в свою чергу патологічні, хронічні зміни в печінці, можуть бути усунені або підтримані реакцією кісткового мозку. З цією метою у молодих і старих тварин індукували фіброз печінки багаторазовим послідовним введенням сірчаноокислої міді в організм [100].

3.3.2. Деякі характеристики адаптивної відповіді при індукції фіброзу печінки на рівні кісткового мозку в залежності від сформованих раніше (імпринтованих) характеристик

Виявилося, що наявність фіброзу печінки викликало вік-залежну адаптивну відповідь на рівні ККМ. Так, вміст іонів міді в ККМ молодих тварин на тлі Су-

індукованого фіброзу печінки збільшувався тільки на 48% від вихідного рівня, в той час як в клітинах печінки її вміст збільшувався багаторазово [139] (Табл. 3.3). У той же час, вміст іонів міді в ККМ старих тварин збільшувався в 3,3 рази від вихідного рівня (Табл. 3.3). Однак, навіть після таких змін вміст іонів міді в ККМ старих тварин залишався в 2,4 рази менше в порівнянні з молодими тваринами (Табл. 3.3).

На тлі збільшення кількості іонів міді в ККМ молодих тварин вміст кальцію зменшувався на 57% в порівнянні з вихідним рівнем, в той час, як в ККМ старих тварин, вміст іонів міді не змінювався від вихідного рівня (Табл. 3.3).

Вміст ROS в ККМ на тлі розвитку Cu-індукованого фіброзу печінки також мав виражену вік-залежну відповідь. Кількість ROS в ККМ молодих тварин збільшувалася від їх вихідного рівня на 28%, а в ККМ старих тварин залишалася незмінною, при цьому вміст ROS в ККМ старих тварин з Cu-індукованим фіброзом печінки залишався менше в порівнянні з молодими тваринами на 42% (Табл. 3.3).

Настільки виражені вік-залежні різноспрямовані зміни в іонному складі і показниках редокс-системи клітини супроводжувалися зміною співвідношень диференційованих типів в кістковому мозку. Так, в кістковому мозку старих тварин на тлі Cu-індукованого фіброзу печінки було збільшено вміст паличкоядерних нейтрофілів на 98%, метамієлоцитів на 103%, лімфоцитів в 1,5 рази, мієлоцитів в 3 рази, і зменшено вміст сегментоядерних нейтрофілів в 1,6 рази порівняно з молодими тваринами (Рис. 3.20 Б).

У тому разі, якщо у тварин був викликаний Cu-індукований фіброз печінки, то проліферативна активність ККМ в культурі була знижена в порівнянні з інтактними тваринами (Рис. 3.20 А). Однак ефект інгібування проліферативної активності ККМ, отриманих у молодих і старих тварин, був різним. Так, кількість ККМ, отриманих у молодих тварин, збільшувалася через добу після початку культивування, а на 2-4 добу культивування вона достовірно не змінювалася (Рис. 3.20 А). У той же час, кількість ККМ, отриманих у старих тварин, незначно збільшувалася, і до 3 діб культивування їх кількість була достовірно вища за початкову кількість в 2 рази (Рис. 3.20 Б). Отже, незважаючи на значне збільшення

лімфоцитів в ККМ на тлі фіброзу печінки, їх проліферативна активність була зменшена в порівнянні з інтактними тваринами.

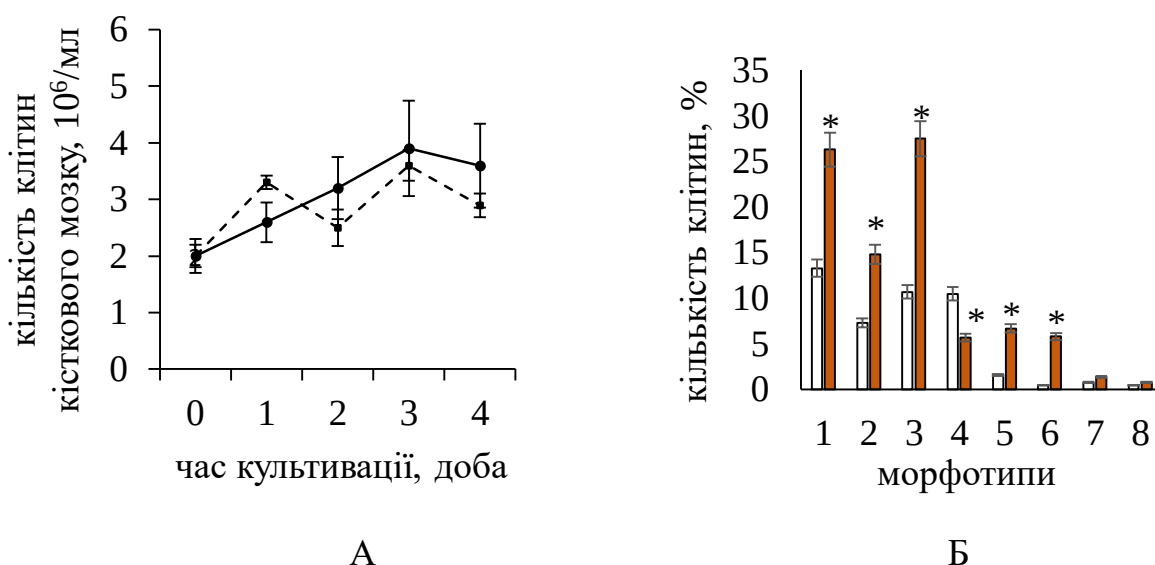


Рис. 3.20 Проліферативна активність клітин кісткового мозку в первинній культурі, які виділені у молодих (—■—) і старих (---■---) тварин з Cu-індукованим фіброзом печінки (А). Морфотипи клітин крові молодих (□) тварин і старих (■) тварин з Cu-індукованим фіброзом печінки (Б):

- | | |
|-------------------------------|--------------------------------|
| 1 – паличкоядерні нейтрофіли; | 2 – метамієлоцити; |
| 3 – лімфоцити; | 4 – сегментоядерні нейтрофіли; |
| 5 – мієлоцити; | 6 – еозинофіли; |
| 7 – базофіли; | 8 – моноцити. |

* відмічені варіанти, для яких $p \leq 0,05$ в порівнянні з молодими тваринами, по тесту Манна – Уїтні.

Фіброз печінки молодих тварин супроводжувався достовірним збільшенням електропровідності суспензії ККМ в порівнянні з вихідним значенням (Рис. 3.21 А). При цьому її значення практично збігалось з електропровідністю суспензії ККМ, отриманих у інтактних старих тварин (Рис. 3.21 А). У той же час, фіброз печінки у старих тварин не чинив достовірних змін електропровідності суспензії клітин кісткового мозку в порівнянні з їх вихідним рівнем, який був досить високий у інтактних тварин (Рис. 3.21 Б).

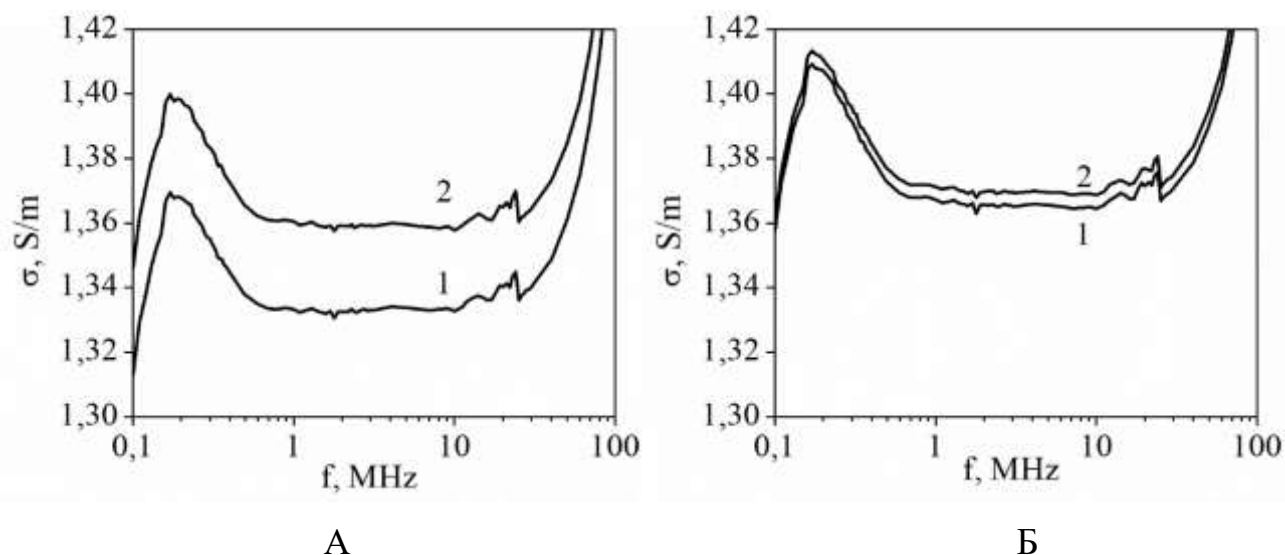


Рис. 3.21 Питома електропровідність σ в діапазоні частот f від 100 кГц до 100 МГц суспензії клітин кісткового мозку молодих інтактних тварин (1) і тварин з фіброзом печінки (2) (А), а також старих інтактних тварин (1) і тварин з фіброзом печінки (2) (Б). Представлені типові криві з трьох незалежних вимірювань.

Отримані результати вказують на те, що фіброз печінки, а точніше, змінене мікрооточення ККМ на тлі фіброзу, індукує зміну в іонному складі, редокс-системі клітин і спрямованості диференціювання ККМ. Для цих змін існує виражений вік-залежний характер. Однак, ці зміни мали різноспрямований характер, тобто патерни цих показників були різними як у тварин різного віку, так і на тлі Cu-індукованого фіброзу у молодих і старих тварин. Вказані зміни в функціональній активності відображалися на значенні електропровідності суспензії ККМ.

3.4. Дослідження зв'язку електропровідності компонентів молозива з температурою, складом (цільне молозиво, знежирене молозиво, низькомолекулярні компоненти), концентрацією білків та термінами зберігання

Молозиво – унікальна рідина, яка утворюється в молочних залозах тільки протягом декількох днів після пологів [140, 141] і багата імуноглобулінами та іншими факторами зростання [142] з надзвичайно широким набором біологічно

активних речовин [143]. Показано, що передача імуноглобулінів новонародженим через колострум називають колострумним імунітетом [144], і він є найважливішим чинником виживання новонароджених в ранньому післяпологовому періоді [145]. Поряд з імунітетом, компоненти молозива забезпечують формування метаболізму і його епігенетичної складової. У зв'язку з цим дослідження складу молозива представляє великий інтерес, так як воно впливає на особливості постнатального розвитку, захист від інфекційних агентів та інших негативних факторів середовища.

3.4.1 Температурна залежність електропровідності цільного і знежиреного молозива

Відомо, що на електропровідність речовини впливає температура в вимірювальній комірці. Виявили, що зі збільшенням температури в діапазоні від 14 °C до 19 °C спостерігалось лінійне збільшення електропровідності, і це проявлялось в однаковій мірі, у випадку як цільного, так і знежиреного молозива (Рис. 3.22).

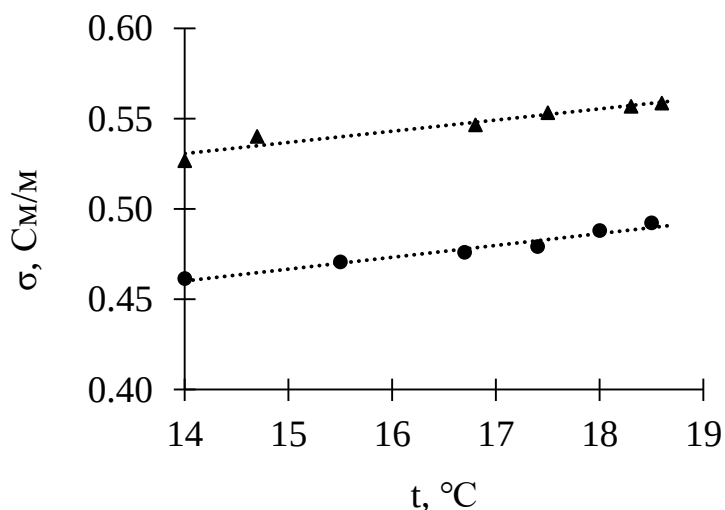


Рис. 3.22 Електропровідність цільного молозива (●) і знежиреного молозива (▲) в діапазоні температур від 14 °C до 19 °C при частоті електричного струму 0,49 МГц. Представлені типові криві електропровідності з трьох незалежних повторностей.

В подальшій роботі всі вимірювання електропровідності проводилися при температурі 18 °С.

3.4.2 Електропровідність цільного молозива і компонентів молозива, отриманих у різних корів

Відомо, що ліпіди проявляють властивості діелектриків [146], і їх видалення супроводжується збільшенням електропровідності [18]. Видалення ліпідів у молозива показало, що в знежиреному молозиві були присутні на сухий залишок 92% білків, 7,69% вуглеводів і 0,31% припадало на вітаміни та інші речовини, в тому числі іони (Рис. 3.23). Можна стверджувати, що знежирене молозиво є концентрованим розчином білків з різною молекулярною масою.

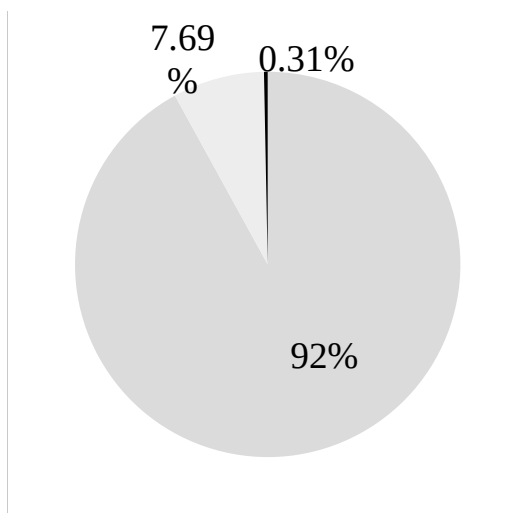


Рис. 3.23 Вміст білка (■), цукрів (■) та інших не ідентифікованих компонентів (■) в сухій частці знежиреного молозива.

Електропровідність цільного молозива, яку вимірювали при температурі $18 \pm 0,5$ °С, варіювалася у різних корів від 0,37 до 0,43 См / м (Рис. 3.24).

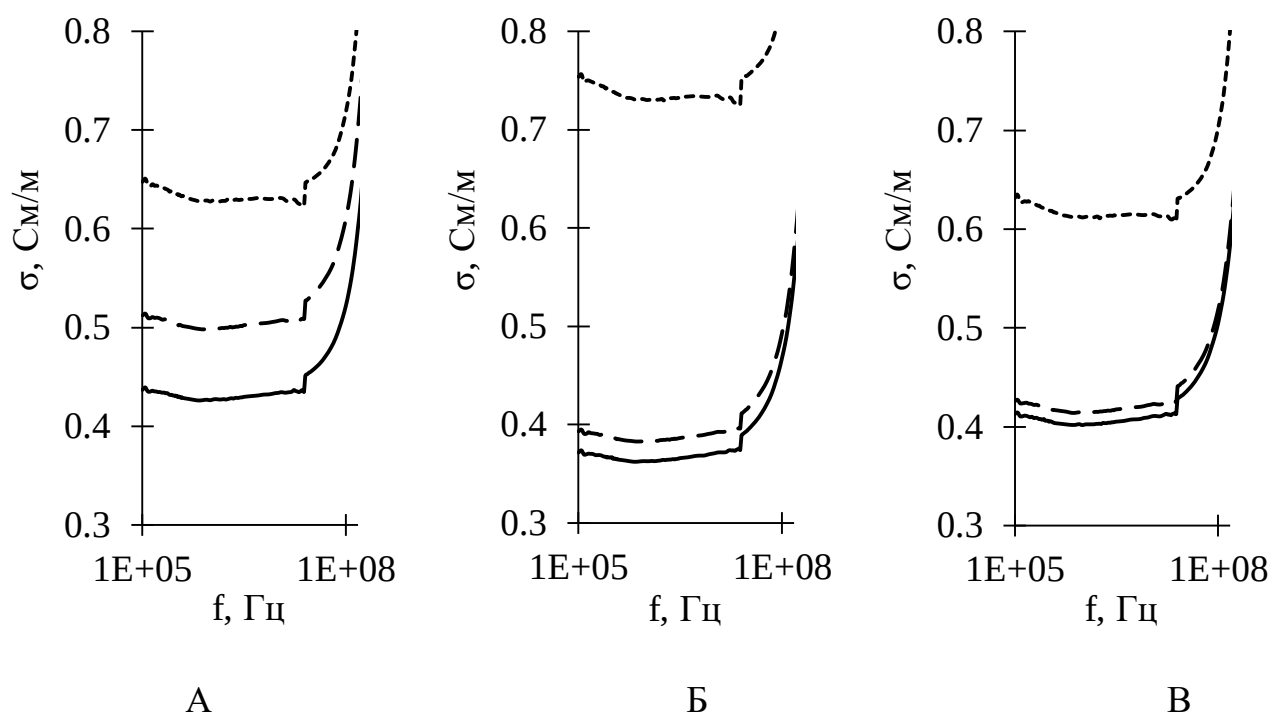


Рис. 3.24 Електропровідність σ цільного молозива (—), знежиреного молозива (---) і низькомолекулярних компонентів молозива (-.-.-) в діапазоні частот 100 кГц – 100 МГц, яке отримано від «Аврори» (А), від «Барині» (Б), від «Мухи» (В).

Видалення ліпідів з цільного молозива супроводжувалося збільшенням електропровідності в порівнянні з цільним молозивом, однак, якщо у «Аврори» це збільшення становило 17,0% від вихідного рівня, то у «Барині» і «Мухи» тільки на 5,6 і 2,9 % відповідно (Рис. 3.24). Ці результати дозволяють вважати, що кількість жирів в молозиві різних корів різна або вклад жирів в електропровідність молозива не суттєвий.

3.4.3 Білковий склад цільного молозива і компонентів молозива і його взаємозв'язок з електропровідністю

Як зазначалося, до складу молозива входить велика кількість білків з різною молекулярною масою, які можуть відрізнятися також по заряду і впливати на електропровідність.

Так, визначення складу білків методом мас-спектрометрії показало, що до складу цільного молозива входить кілька сотень білків з молекулярною масою від 4 до 20 кДа (Рис. 3.25 А, Б). У найбільших кількостях в складі молозива представлені білки з молекулярною масою від 4 до 9 кДа і фракція казеїну з молекулярною масою від 19 до 20,5 кДа (Рис. 3.25 А, Б). Поряд зі схожістю білкового складу молозива, отриманого у різних корів, виявлялися кількісні і якісні відмінності (Рис. 3.25 А, Б).

Видалення більшої частини високомолекулярних білків (більше 10 кДа) мембранної фільтрацією дозволило ідентифікувати 27 фракцій білків з молекулярною масою від 4835 до 9470 Да у «Аврори» і 30 фракцій білків в цьому ж діапазоні молекулярних мас у «Барині» (Рис. 3.25 В, Г).

Необхідно відзначити, що для білків молозива, отриманих у «Аврори» і «Барині», відсутній повний збіг спектральних характеристик за молекулярною масою, і тільки 5 фракцій білків були ідентичні (Рис. 3.25 В, Г; Табл. 3.4). Отже, можна говорити про наявність виражених індивідуальних характеристик білкових спектрів молозива.

На користь високої варіабельності складу білків молозива свідчать також дані інших досліджень. Найбільший інтерес представляють білки молозива з молекулярною масою близько 5 кДа – так званий антиген-специфічний трансфер-фактор SFT [147]. Вперше молекулярний аналіз антиген-специфічних білків молозива було проведено в роботі [148] і показано, що понад 200 різних білків молозива володіють імуномодуючими та імунозаміщувальними властивостями [149].

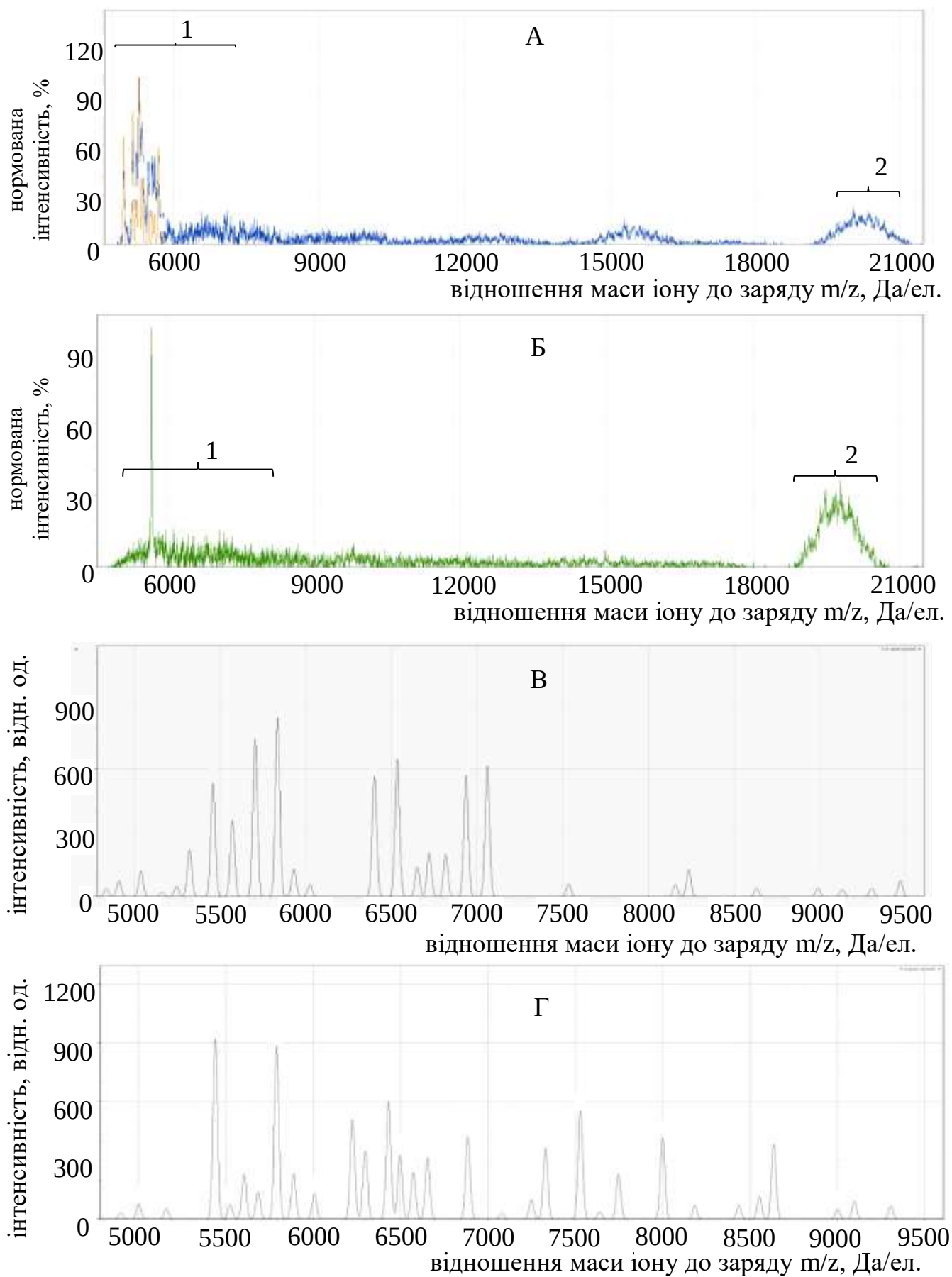


Рис. 3.25 Склад білків знежиреного молозива за даними мас-спектрометрії: А – молозиво, отримане від «Аврори»; Б – молозиво, отримане від «Барині». 1 – склад

білків з молекулярною масою від 4 до 9 кДа і 2 – фракції молозива з молекулярною масою від 19 до 20,5 кДа. Склад білків низькомолекулярних фракцій молозива за даними мас-спектрометрії: В – молозиво, отримане від корови «Аврора»; Г – молозиво, отримане від корови «Бариня». Представлені типові спектри білків.

Таблиця 3.4

Склад білків низькомолекулярних фракцій молозива за даними мас-спектрометрії, відношення молекулярної маси до заряду білків у «Аврори» і «Барині», темним кольором відзначені білки, що збігаються по відношенню молекулярної маси до заряду у «Аврори» і «Барині».

Діапазон значень m/z, Да	Кличка корови	Групи білків по відношенню маси до заряду m/z, Да в зазначених діапазонах						
4800–5300	«Аврора»	4835	4909			5037	5159	5245
	«Бариня»			4897	5000		5158	
5300–5700	«Аврора»	5321		5458		5571		
	«Бариня»		5438		5524		5603	5683
5700–6100	«Аврора»	5703		5835		5930		6024
	«Бариня»		5790		5886		6005	
6100–6600	«Аврора»			6400			6534	
	«Бариня»	6224	6297		6430	6496		6573
6600–7100	«Аврора»	6650	6720	6816		6934	7059	
	«Бариня»	6653			6884			7078
7100–8000	«Аврора»			7534				
	«Бариня»	7248	7329	7528	7639	7747	7999	
8000–9000	«Аврора»	8157		8235			8635	8990
	«Бариня»		8183		8436	8553	8631	
9000–9500	«Аврора»			9131	9304	9470		
	«Бариня»	9001	9097		9305			

Видалення високомолекулярних білків зі знежиреного молозива відбувалося мембранної фільтрацією, вміст білків зменшено в 3,3 рази від вихідного, майже в однаковій мірі у всіх зразків. Видалення високомолекулярних білків супроводжувалося значним збільшенням електропровідності в усіх трьох досліджуваних варіантах (Рис. 3.24). Так, у «Аврори» електропровідність низькомолекулярних компонентів молозива була збільшена на 40,5% і 47,4% в порівнянні зі знежиреним і цільним молозивом відповідно (Рис. 3.24 А). У «Барині»

електропровідність збільшувалася на 96,1% і 101% в порівнянні зі знежиреним і цільним молозивом відповідно (Рис. 3.24 Б), а у «Мухи» – на 50,1% і 52,3% (Рис. 3.24 В).

Необхідно відзначити, що найбільше збільшення електропровідності після видалення високомолекулярних білків молозива спостерігалось для молозива «Барині», і у ньому виявлявся найбільший спектр низькомолекулярних білків (Рис. 3.25 Г).

Отже, високомолекулярні білки (молекулярна маса понад 10 кДа), які становили більшу частину білків молозива, зменшують рухливість іонів в електричному полі.

3.4.4 Математична модель кількості носіїв заряду в розчинах білків

Здатність водних розчинів проводити електричний струм залежить від кількості носіїв заряду, перш за все іонів, і їх рухливості. У тому випадку, якщо носії зарядів представлені білками з великою молекулярною масою, то їх рухливість буде низькою через опір, обумовлений іншими молекулами, що містяться в молозиві. Отже, електропровідність таких багатокомпонентних сумішей з великою кількістю не тільки іонів, але і різних білків, буде залежати від молекулярної маси, розміру молекул, їх заряду і здатності до іонізації.

З метою перевірки цього положення була побудована модель взаємозв'язку молекулярної маси з потенційним зарядом молекули. Оскільки до складу білкової молекули входить різна кількість пептидів з позитивними, негативними зарядами або нейтральних, то білки можуть бути носіями зарядів, і це залежить від складу пептидів.

У даній роботі білки умовно розділені на низькомолекулярні фракції з молекулярною масою близько 6 кДа і фракції з молекулярною масою до 18 кДа. Прийmemo середню молекулярну масу пептиду рівною 120 Да. Таким чином, молекули білків різних фракцій в досліджуваних розчинах містять відповідно близько $6000 / 120 = 50$ і близько $18000 / 120 = 150$ пептидів.

Оцінімо ймовірності події, при якій молекула білка нейтральна, і події, при якій молекула білка має не скомпенсований заряд.

Позначимо кількість пептидів у білку N . Кожен пептид є нейтральним, позитивно зарядженим або негативно зарядженим з імовірностями відповідно p_0 , p_+ и p_- :

$$p_0 + p_+ + p_- = 1. \quad (3.21)$$

Якщо можливі два типи пептидів з імовірностями p_1 и p_2 , $p_1 + p_2 = 1$, то ймовірність події, при якій білок з N пептидів матиме певну послідовність, дорівнює: n_1

$$P_{config} = p_1^{n_1} \cdot p_2^{n_2}, \quad (3.22)$$

де n_1 і n_2 – кількість пептидів першого і другого типу, $n_1 + n_2 = N$.

Загальний заряд молекули білка визначається кількістю пептидів кожного типу без урахування їх послідовності. Врахуємо кількість різних конфігурацій білка з однаковими кількостями n_1 и n_2 :

$$P_{rel} = p_1^{n_1} \cdot p_2^{n_2} \cdot \frac{N!}{n_1! \cdot n_2!}. \quad (3.23)$$

Застосуємо отриману формулу до молекули білка, прийнявши за перший і другий тип пептидів – нейтральні пептиди і заряджені пептиди (незалежно від знака заряду).

$$P_i = p_0^{i_0} \cdot (p_+ + p_-)^{N-i_0} \cdot \frac{N!}{i_0! \cdot (N-i_0)!} \quad (3.24)$$

Дане рівняння показує ймовірність події, при якому молекула білка містить кількість i_0 нейтральних пептидів.

При заданій кількості нейтральних пептидів i_0 кількість заряджених пептидів дорівнює $N-i_0$. Розглянемо випадок молекули зі скомпенсованим зарядом:

$$n_+ = n_- = \frac{N-i_0}{2}. \quad (3.25)$$

Імовірність події, при якому заряд молекули при заданому i_0 скомпенсований, дорівнює:

$$P' = p_+^{\frac{N-i_0}{2}} \cdot p_-^{\frac{N-i_0}{2}} \cdot \frac{(N-i_0)!}{\left(\frac{N-i_0}{2}\right)! \cdot \left(\frac{N-i_0}{2}\right)!}, \quad (3.26)$$

де p'_+ і p'_- – ймовірності подій p_+ і p_- , розраховані з урахуванням того, що подія p_0 вже не настала (тобто пептиди, що залишилися і розглядаються, точно не є нейтральними), $p'_+ + p'_- = 1$.

Ймовірності подій, при яких молекула білка містить рівні кількості позитивних і негативних пептидів при кожній певній кількості нейтральних пептидів i_0 , дорівнюють:

$$\begin{aligned} P_{i_0} &= p_0^{i_0} \cdot (p_+ + p_-)^{N-i_0} \cdot \frac{N!}{i_0! \cdot (N-i_0)!} \cdot p'_+^{\frac{N-i_0}{2}} \cdot p'_-^{\frac{N-i_0}{2}} \cdot \frac{(N-i_0)!}{\left(\frac{N-i_0}{2}\right)! \cdot \left(\frac{N-i_0}{2}\right)!} = \\ &= p_0^{i_0} \cdot (p_+ + p_-)^{N-i_0} \cdot p'_+^{\frac{N-i_0}{2}} \cdot p'_-^{\frac{N-i_0}{2}} \cdot \frac{N!}{i_0! \cdot \left(\frac{N-i_0}{2}\right)! \cdot \left(\frac{N-i_0}{2}\right)!} \end{aligned} \quad (3.27)$$

і при додаванні:

$$P_{neutr} = \sum_{i_0=0}^N p_0^{i_0} \cdot (p_+ + p_-)^{N-i_0} \cdot (p'_+ \cdot p'_-)^{\frac{N-i_0}{2}} \cdot \frac{N!}{i_0! \cdot \left(\left(\frac{N-i_0}{2}\right)!\right)^2}. \quad (3.28)$$

При програмних розрахунках враховувалося, що при непарній кількості $n_+ + n_- = N - i_0$ ймовірність компенсації заряду дорівнює нулю.

Порівняємо концентрацію молекул, що мають електричний заряд, в розчині при наявності високомолекулярних (150 пептидів) і низькомолекулярних (50 пептидів) білків при однаковій масі білків в розчині.

Приймемо, що наявності у пептида позитивного і негативного заряду рівновірогідні, $p_+ = p_-$. Розглянемо три випадки: з нульовою ймовірністю нейтральності пептидів ($p_+ = 0, p_+ = p_- = 0,5$), з ймовірністю нейтральності пептидів, що дорівнює 50 % ($p_+ = 0,5, p_+ = p_- = 0,25$) і з ймовірністю нейтральності пептидів, що дорівнює 90 % ($p_+ = 0,9, p_+ = p_- = 0,05$).

Розрахунки відповідно до формули (11) показали, що у всіх трьох випадках молекула білка з кількістю пептидів 150 з більшою ймовірністю є зарядженою, ніж молекула білка з кількістю пептидів 50 (відповідно $P_{50} = 88,77$ %, $P_{150} = 93,50$ % для випадку $p_+ = 0, p_+ = p_- = 0,5$; $P_{50} = 99,99$ %, $P_{150} \approx 100$ % для випадку $p_+ = 0,5, p_+ = p_- = 0,25$; $P_{50} = 99,44$ %, $P_{150} \approx 99,99$ % для случая $p_+ = 0,9, p_+ = p_- = 0,05$).

Молекулярна маса високомолекулярних фракцій в три рази перевищує

молекулярну масу низькомолекулярних фракцій. Це означає, що при однаковому вмісті білка m в розчині кількість молекул низькомолекулярних фракцій в три рази більше, ніж високомолекулярних, оскільки $N'=m/M$.

Навіть в разі максимальної з отриманих шляхом розрахунків відмінності ймовірностей заряду молекули ($P_{50}=88,77\%$ і $P_{150}=93,50\%$) розрахункова середня концентрація носіїв заряду в розчині низькомолекулярних фракцій більше в 2,85 разів:

$$\frac{C_{50}}{C_{150}} = \frac{N_{50}P_{50}}{N_{150}P_{150}} = \frac{3 \cdot 0,8877}{0,935} \approx 2,85. \quad (3.29)$$

Крім концентрації вільних носіїв заряду, на електропровідність впливає їх рухливість. Низькомолекулярні фракції завдяки меншому розміру молекули мають більшу рухливість в розчині, що на якісному рівні також підтверджує їх більшу електропровідність та не суперечить результатам, що показала розроблена математична модель.

3.4.5 Вплив строків зберігання молозива на електропровідність

Важливим завданням практичного використання молозива є підтримання умов зберігання до переробки молозива. оскільки в процесі заморожування з наступним розморожуванням біологічно активні сполуки можуть втрачати свою активність, представляла інтерес оцінка характеристик молозива, зокрема електропровідності, при зберіганні при 3-4 °C.

Було виявлено, що електропровідність при зберіганні різних фракцій молозива (цільне, знежирене і низькомолекулярні фракції) збільшувалася з перших до 18 діб зберігання при 3-4 °C (Рис. 3.26).

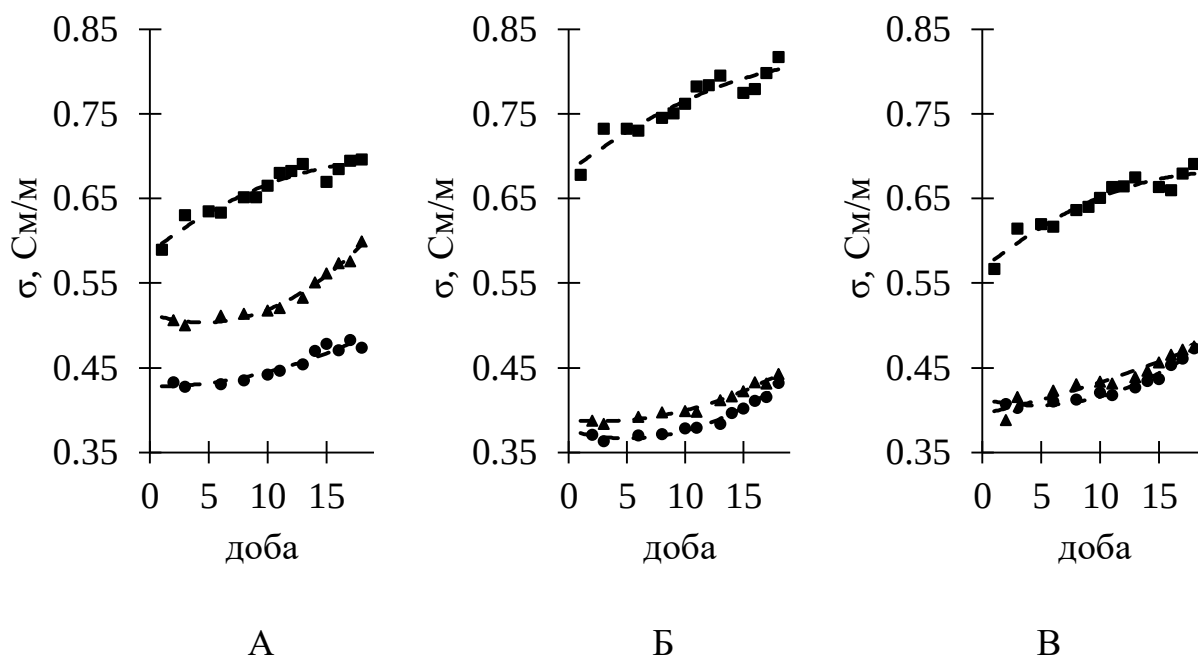


Рис. 3.26 Електропровідність цілого молозива (●), знежиреного молозива (▲) і низькомолекулярних компонентів молозива (■) при робочій частоті електричного струму 0,49 МГц при температурі 18 °С з 1 по 18 добу зберігання при температурі 3 °С. А – молозиво, отримане від корови «Аврора»; Б – молозиво, отримане від корови «Бариня»; В – молозиво, отримане від корови «Муха».

Однак динаміка приросту електропровідності була різною для різних фракцій молозива. Так, електропровідність цілого і знежиреного молозива залишалася незмінною з 1 по 10 добу зберігання, і тільки після цього спостерігалось невелике зростання електропровідності (Рис. 3.26). У той же час електропровідність низькомолекулярної фракції компонентів молозива з першої доби лінійно зростала. На 18 добу вказаний параметр був збільшений на 18%, 20% і 22% в порівнянні з вихідною величиною у «Аврори», «Барині» і «Мухи» відповідно (Рис. 3.26).

Отже, в складі цілого і знежиреного молозива електропровідність залишається відносно стабільним показником навіть при тривалому зберіганні до 18 діб при 3 °С. У той же час, якщо з молозива видалені жири і високомолекулярні білки, то електропровідність в процесі зберігання лінійно збільшувалася в процесі зберігання з 1 по 18 добу. Це може свідчити про більшу швидкість деградації низькомолекулярних білків у порівнянні з цілим і знежиреним молозивом.

Електропровідність визначається кількістю заряджених частинок в рідкому середовищі і їх здатністю переміщатися в електричному полі [150]. Збільшення температури в вимірювальній комірці прискорює рухливість іонів і молекул, і ця залежність була лінійною в діапазоні температур 14-19 °С (Рис. 3.22). Ця залежність зберігається як для цільного молозива, так і для знежиреного (після видалення ліпідів) молозива (ис. 3.22). Збільшення електропровідності знежиреного молозива в порівнянні з цільним молозивом пояснюється тим, що ліпіди мають властивості діелектриків [146].

Виявилося, що видалення ліпідів з молозива, отриманого у різних корів, супроводжувалося збільшенням електропровідності в порівнянні з цільним молозивом в різній мірі (Рис. 3.24). Це може пояснюватися тим, що співвідношення ліпідів і білків в молозиві, отриманому від різних виробників, різне. Цей факт є важливим в розумінні біологічної цінності молозива. Вирішення цього питання вимагає додаткових досліджень. Однак отримані результати свідчать про можливість визначення цього показника (співвідношення білків / ліпідів) в молозиві методом електропровідності. Отримані результати підтверджують дані про різноманіття білків молозива, тому можна стверджувати, що для молозива характерний унікальний, індивідуальний білковий профіль (Рис. 3.25; Табл. 3.4). Електропровідність молозива залежить від складу білків. Видалення високомолекулярних білків супроводжувалося значним збільшенням електропровідності, і це проявлялося в різній мірі для молозива, отриманого від різних виробників (Рис. 3.22).

На користь того, що на електропровідність впливає не тільки заряд, але і розмір і, можливо, геометрія білкової молекули, свідчать дані про збільшення електропровідності в процесі зберігання компонентів молозива (Рис. 3.26). Оскільки в процесі зберігання білкові молекули піддаються гідролізу і зміні конформаційних характеристик [151], це супроводжувалося збільшенням електропровідності. Метод електропровідності може бути використаний в оцінці нативних компонентів молозива.

Отримані результати дозволяють рекомендувати електропровідність молозива

і його компонентів для їх інтегральної оцінки при технології переробки молозива. Використання методу імпедансної спектроскопії в процесі переробки молозива не має аналогів і може доповнити методи вимірювання фізико-хімічних характеристик молозива, які використовуються в даний час.

Разом з тим цей підхід має свої особливості і обмеження, зокрема, відсутні дані про вплив конкретних показників (вмісту іонів, амінокислот, повного складу білків та інших) на електропровідність. Подальші дослідження в модельних експериментах повинні бути спрямовані на розробку теорії електропровідності складних біологічних рідин.

3.4.6 Дослідження зв'язку електропровідності знежиреного молозива та низькомолекулярних компонентів молозива з концентрацією білків у досліджуваному середовищі

Визначення залежності питомої електропровідності від концентрації білка в розчині в вимірювальній комірці показало, що в разі молозива, отриманого у «Аврори», при внесенні 2 і 4 мг / мл білка електропровідність знежиреного молозива була однаковою, а при внесенні в клітинку 10 мг / мл вона збільшувалася на 2% (Рис. 3.27 А). У тому випадку, якщо знежирене молозиво було отримано у «Барині», то збільшення концентрації білка в вимірювальній комірці не приводило до збільшення електропровідності, як і для молозива «Аврори» (Рис. 3.27 В).

У тому разі, якщо у знежиреного молозива видаляли високомолекулярні білки (з молекулярною масою більше 10 кДа), які становили більшу частину білків, то спостерігали лінійну залежність між збільшенням електропровідності і вмістом низькомолекулярних білків в комірці, якщо молозиво було отримано у «Барині» (Рис. 3.27 Г), і нелінійне збільшення в разі молозива, отриманого у «Аврори» (Рис. 3.27 Б).

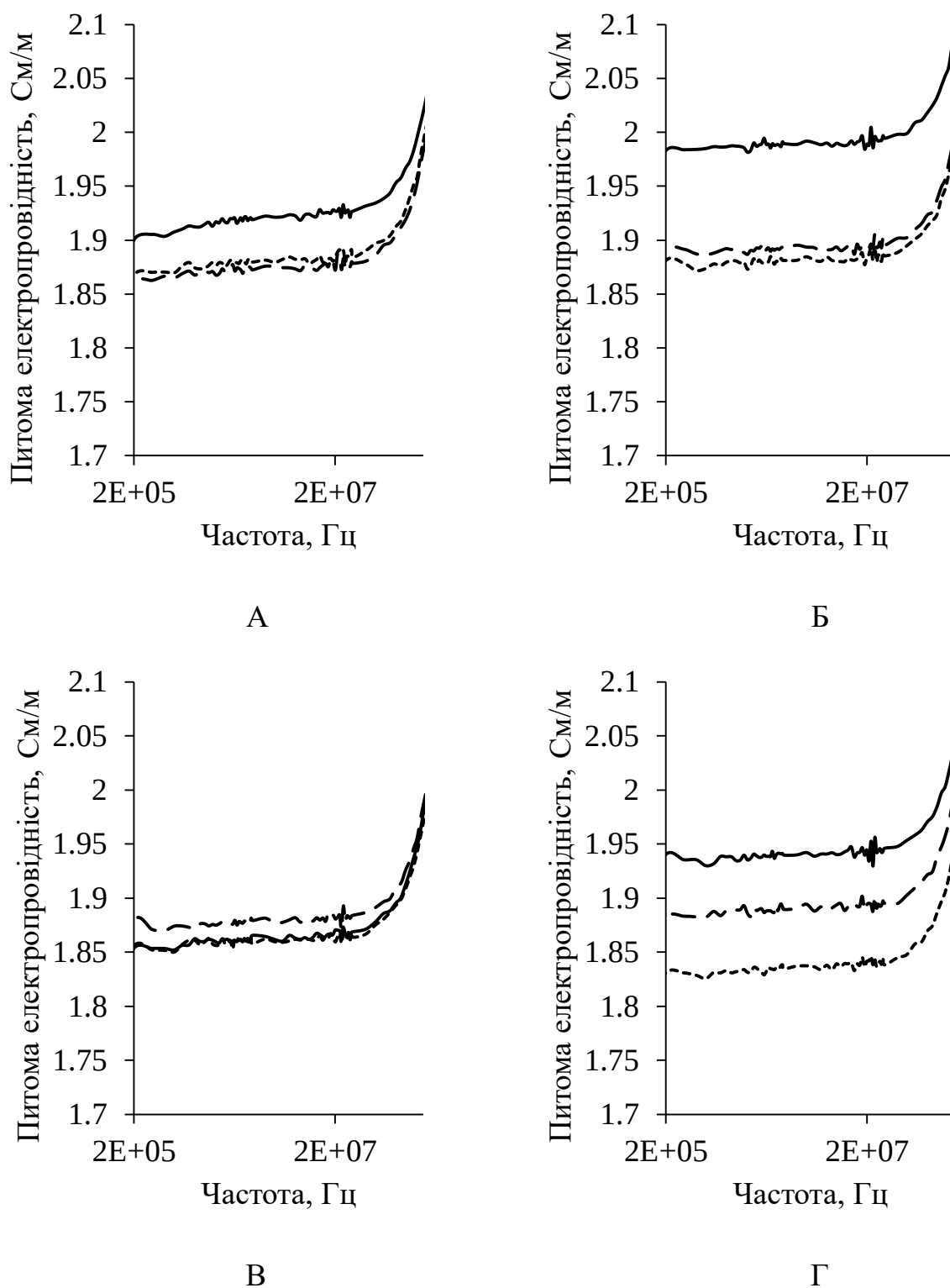


Рис. 3.27 Електропровідність знежиреного молозива (А) і низькомолекулярних компонентів молозива (Б) при внесенні в вимірювальну комірку 2 мг / л (----), 4 мг / л (— —) і 10 мг / л (—) білків в разі отримання молозива у «Аврори» і електропровідність знежиреного молозива (В) і низькомолекулярних компонентів молозива (Г) в тих же концентраціях в разі отримання у «Барині».

Отже, для електропровідності як знежиреного молозива, так і низькомолекулярних білків молозива виявляється індивідуальний характер зміни електропровідності, і ці характеристики були різними для молозива різних корів. Ці результати можуть свідчити про те, що співвідношення заряджених / нейтральних молекул у різних корів різний, і електропровідність може служити інтегральним показником багатокomпонентних сумішей. Електропровідність залежить не тільки, а можливо не стільки від кількості заряджених молекул і іонів, а визначається співвідношенням розмірів молекул в суміші (низькомолекулярні і високомолекулярні білки).

З огляду на ці виражені індивідуальні особливості характеристик молозива, для усунення індивідуальних відмінностей ми пропонуємо при отриманні біологічно активних субстанцій до переробки молозива об'єднувати молозиво як мінімум 5 виробників, і дослідження компонентів молозива як біологічно активних речовин проводити на груповому рівні. На наступному етапі роботи, молозиво отримано у 5 корів однієї і тієї ж породи і було об'єднано, знежирено, і були отримані низькомолекулярні компоненти, використані в якості біологічно активних комплексів.

3.4.7 Вплив низькомолекулярних компонентів молозива на деякі показники редокс-систем організму після інтоксикації сірчаною кислотою

Відомо, що в неонатальному і ранньому постнатальному онтогенезі відбувається програмування метаболізму, яке визначає не тільки особливості онтогенезу, але і ризик виникнення цілого ряду патологій [152, 153]. Було показано, що надлишкове харчування в ранньому післяпологовому періоді формувало специфічні метаболічні патерни, які зберігалися протягом усього онтогенезу і корелювали з тривалістю життя [154]. В даний час ведуться активні дослідження впливу особливостей вигодовування тварин на ранніх етапах онтогенезу на механізм метаболічного та імунологічного програмування і формування процесів епігенетичної регуляції.

Великий інтерес в цьому відношенні представляє дослідження молозива і його впливу на функціонування біологічних систем. Це пояснюється тим, що у жуйних тварин структура плаценти перешкоджає передачі імуноглобулінів плоду, і новонароджені телята позбавлені так званого пасивного імунітету [144, 155, 156]. В процесі еволюції у ссавців сформувалася система передачі комплексу молекул, які забезпечують підтримку імунітету і програмування метаболізму за допомогою молозива.

Дослідженню складу молозива присвячена велика кількість робіт і показано, що воно дуже багате білками, і їх склад залежить від «продуцента», містить відносно невелику кількість жирів [157], воно багате мікроелементами [158]. Однак, найважливішою характеристикою молозива можна вважати його нестабільність і динамічність складу. У зв'язку з цим необхідний пошук або розробка методів, що дозволяють оцінювати динаміку зміни інтегральних характеристик молозива.

В якості таких інтегральних показників багатокомпонентних динамічних біологічних сумішей може бути використана імпедансна спектроскопія для вимірювання електропровідності. Цей підхід дозволяє оцінити загальний вміст заряджених іонів і інших молекул в молозиві [18]. З огляду на те, що найбільшою біологічною активністю в механізмах регуляції метаболізму володіють пептиди і низькомолекулярні білки, то можна очікувати, що показник електропровідності компонентів молозива може дозволити проводити швидку оцінку якості і потенційної біологічної активності складних, багатокомпонентних, динамічних сумішей. Однак, яким є «внесок» білків, зокрема білків з різною молекулярною масою, в показник електропровідності, залишається не дослідженим.

У зв'язку з цим, досліджували в діапазоні молекулярних мас від 4800 Да до 9500 Да склад білків молозива, яке було отримано у різних корів, і електропровідність знежиреного молозива і фракцій низькомолекулярних білків молозива, а також вплив низькомолекулярних компонентів молозива на деякі показники редокс-системи організму (вміст гідроперекисей ліпідів і активність глутатіонпероксидази в сироватці крові) на тлі інтоксикації тварин іонами міді.

Дослідження білків молозива з молекулярної масою від 4800 Да до 9500 Да показало, що у корови «Аврора» виявлялося 27 фракцій (Рис. 3.25 В). Вміст цих білків був різним, найбільшу кількість доводилося на білки з молекулярною масою 5500-6000 Да й 6500-7000 Да (Рис. 3.25 А).

Склад білків молозива в цьому діапазоні молекулярних мас у корови «Бариня» був іншим. Так, методом мас-спектроскопії було ідентифіковано 31 фракцію (Рис. 3.25Г). Якщо провести аналіз наявності збігів білкових фракцій молозива, отриманого у різних корів, то можна зробити висновок, що тільки 5 фракцій були однакові у двох корів (Табл. 3.4).

Отримані результати вказують на те, що молозиво, як і більшість біологічних субстанцій, має унікальний склад, тобто залежить від генетичних і епігенетичних характеристик виробника. Ці особливості необхідно враховувати при отриманні і подальшій стандартизації багатокомпонентних біологічних сумішей.

Інтоксикація експериментальних тварин сірчаною кислотою міддю супроводжувалася втратою маси тіла тварин протягом перших 2-3 діб (Рис. 3.28 А). Надалі маса тіла у цих тварин залишалася незмінною до 10-12 діб, після чого вони знову відновлювали зростання маси тіла, і через 16 діб від початку експерименту не відрізнялися від контрольної групи (Рис. 3.28 А).

Втрата маси і зупинка росту спостерігалася на тлі достовірного зниження температури тіла (Рис. 3.28 Б). Так, якщо температура тіла у інтактної контрольної групи залишалася незмінною протягом експерименту і становила 37,5 °С, то у тварин після інтоксикації була на 1 °С нижче контролю (Рис. 3.28 Б).

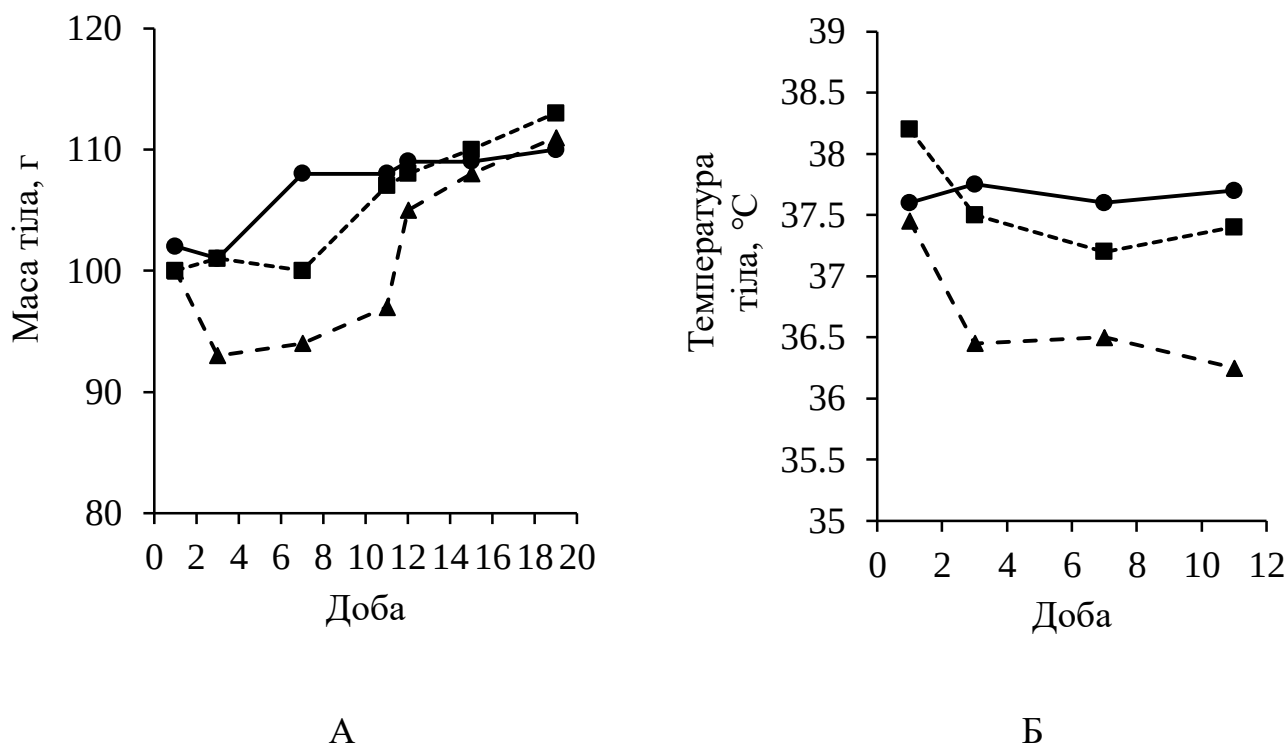


Рис. 3.28 Змінення фізіологічних показників в контрольній групі тварин (▲), у тварин після отримання сірчаноокислої міді (■) і у тварин з токсикозом після отримання низькомолекулярних компонентів молозива в дозуванні 0,1 мг / 100 г маси тіла (●): А – маса тіла; Б – температура тіла. Представлені середні значення з п'яти тварин в кожній групі.

У тому випадку, якщо тварини отримували низькомолекулярні компоненти молозива (НКМ) *per os* і їм вводили сірчаноокислу мідь, то зростання їх маси тіла зупинялося в порівнянні з контролем. Уже після 6-ї доби від початку експерименту у них поновлювалося зростання, і до 20 діб і вони не відрізнялися і навіть незначно перевершували контрольну групу (Рис. 3.28 А). При цьому температура тіла цих тварин, які отримали НКМ на тлі інтоксикації, не відрізнялася від такої контрольних тварин (Рис. 3.28 Б).

Відтак, НКМ здатні усувати негативну інгібуючу дію сірчаноокислої міді на метаболізм і можуть розглядатися як потенційний антидот. Механізми цього ефекту можуть бути надзвичайно різноманітними.

Відомо, що іони міді можуть проявляти прооксидантну дію, яка пов'язана зі збільшенням вмісту продуктів вільнорадикальних реакцій [159].

У наступній серії експериментів було показано, що через 24 години після останнього введення тваринам сірчаноокислої міді вміст гідропероксидів ліпідів в сироватці крові було збільшено в порівнянні з контролем на 75% (Рис. 3.29 А).

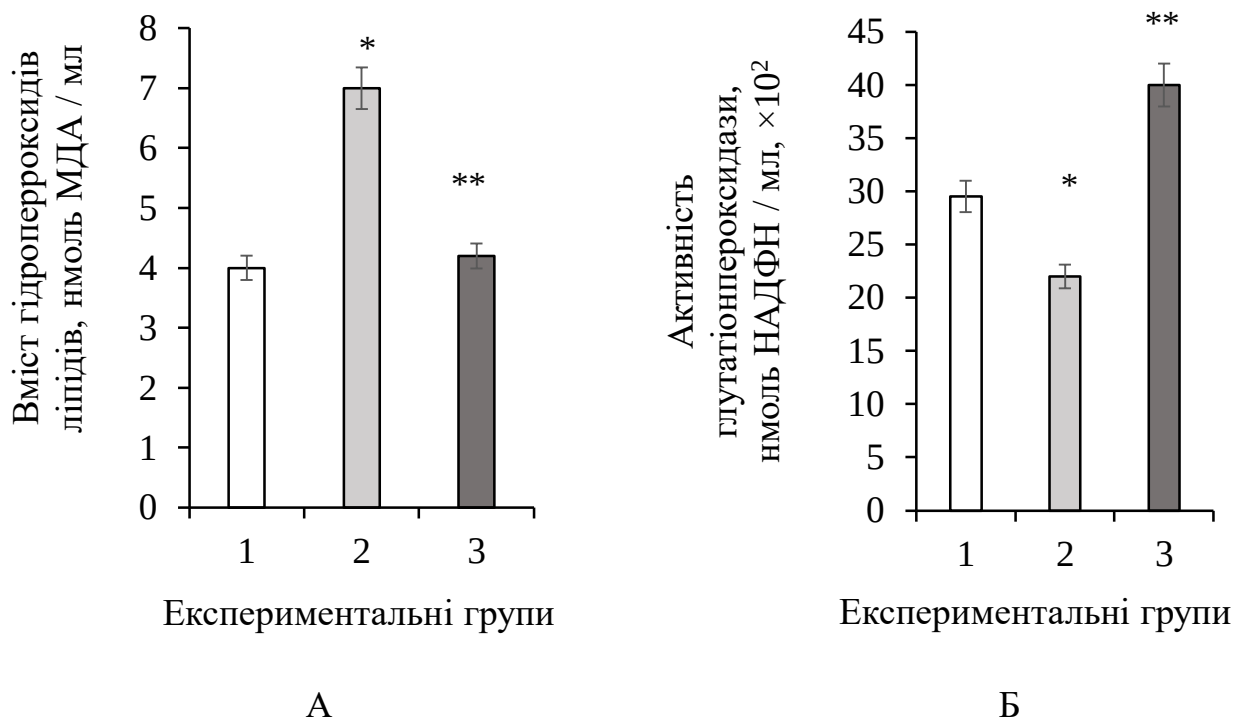


Рис. 3.29 Змінення показників редокс-системи контрольних тварин (1), тварин з токсикозом (2) і тварин з токсикозом, яким вводили низькомолекулярні компоненти молозива в дозуванні 0,1 мг / 100 г маси тіла (3): А – вміст гідроперекисів ліпідів в сироватці крові; Б – активність глутатіонпероксидази в сироватці крові.

В кожній групі представлені середні значення з п'яти тварин.

* відмічені варіанти, для яких $p \leq 0,05$ в порівнянні з контрольною групою, по тесту Манна – Уїтні.

** відмічені варіанти, для яких $p \leq 0,05$ в порівнянні з тваринами з токсикозом, яким не вводили низькомолекулярні компоненти молозива, по тесту Манна – Уїтні.

Таке збільшення вмісту продуктів вільнорадикальних реакцій відбувалося на тлі пригнічення (на 36%) одного із «центральных» антиоксидантних ферментів – глутатіонпероксидази (Рис. 3.29 Б).

У тому випадку, якщо на тлі інтоксикації тварини отримували трикратно НКМ в дозі 0,1 мг / 100 г маси тіла, то вміст гідропероксидів ліпідів в сироватці крові не відрізнявся від контролю. Активність глутатіонпероксидази в цьому випадку навіть перевершувала таку інтактних контрольних тварин на 30% (Рис. 3.29 Б).

Отже, механізми усунення токсичної дії іонів міді низькомолекулярними компонентами молозива реалізується через регуляцію редокс-системи організму. На основі НКМ можуть бути розроблені медичні препарати, здатні усувати токсичну дію іонів важких металів і, можливо, інших токсикантів. В якості методів стандартизації зазначених медичних препаратів на основі субстанцій молозива на різних стадіях виробництва запропоновано використовувати імпедансну спектроскопію.

Розглядаючи «індивідуальний» характер складу білків з низькою молекулярною масою (менше 10 000 Да), необхідно відзначити, що це обумовлено декількома причинами: генетичними характеристиками, фізіолого-біохімічним статусом, який є результатом взаємодій і взаємовпливів генома з умовами утримання тварин, віком, кількістю отелень і мабуть найбільш динамічним – часом і кількістю надоїв після отелення [160]. Поряд з цим, на склад молозива і білків буде впливати сезонність і цілий ряд інших факторів [161, 162]. Не можна виключати і час зберігання молозива, оскільки в його склад входять різноманітні ферменти, що проявляють протеазну активність. У зв'язку з цим можна стверджувати, що за складом молозиво – це унікальна, високодинамічна субстанція, що володіє вираженою біологічною активністю. Ці особливості ускладнюють отримання біологічних субстанцій з молозива. Це пов'язано з тим, що не вдається отримувати субстанції з однаковими стандартними характеристиками, а методи контролю вимагають великих часових і матеріальних витрат.

Вирішення цих питань може бути забезпечено об'єднанням молозива, отриманого у п'ятьох і більше тварин, що дозволить усунути яскраво виражені індивідуальні характеристики. В якості методу контролю як молозива, так і отриманих з нього компонентів, може бути використано метод імпедансної

спектроскопії. Оскільки електропровідність залежить не тільки від вмісту іонів, але і від кількості ліпідів і високомолекулярних білків, що було показано в рамках роботи, цей метод дозволяє отримувати дані про співвідношення різних молекул в складі молозива, що є важливою характеристикою біологічної активності субстанцій. На користь цього свідчать отримані дані щодо впливу НКМ на захист організму від токсичних дій сірчаної кислоти.

Висновки до розділу 3

Метод імпедансної спектроскопії може бути узагальнено при дослідженні залежності діелектричної проникності різних матеріалів від частоти, температури, тиску та інших видів впливів, що необхідно при розрахунку електродинамічних структур і при створенні надширокосмугових НВЧ випромінювачів, поміщених в матеріальне середовище з порядку спадання з частотою діелектричної проникності.

Отримані значення діелектричної проникності біологічних тканин можуть бути використані для розрахунків систем радіотермометрії.

Обґрунтовано перспективи використання НВЧ радіометрії для визначення глибинних температур біологічних об'єктів.

Розглянуто модель розподілу теплових полів всередині біологічного об'єкта при наявності в біологічному об'єкті зон зі зниженою температурою.

Показано, що локалізація джерел зі зниженою температурою при глибинах залягання більше 3 см неможлива методами інфрачервоної термографії.

Досліджено температурні поля в біологічній тканині при наявності зони більш низької температури.

Теоретично показана можливість визначення глибини залягання і розміру зони аномальної температури при використанні двохвильовий радіотермометрії.

Результати досліджень характеристик клітин кісткового мозку в первинній культурі у тварин різного віку з Си-індукованим фіброзом печінки підтверджують те, що сформовані метаболічні патерни в клітинах кісткового мозку молодих і

старих тварин є різними, і одні і ті ж морфотипи клітин можуть мати різну функціональну активність, що визначається адаптивним досвідом, який буде впливати на їх подальшу біологічну відповідь.

Відмінності електропровідності різних біологічних середовищ вказують на кілька важливих обставин. По-перше, біологічні середовища багатокomпонентні і динамічні, в тому сенсі, що в них можуть утворюватися і розпадатися надмолекулярні компоненти. Аналітичні методи аналізу таких середовищ являють великі труднощі. У зв'язку з цим, біофізичні методи можуть бути більш перспективними в характеристиці інтегральних показників таких біологічних середовищ. По-друге, на електропровідність біологічних середовищ великий вплив робить наявність компонентів з діелектричними властивостями і, перш за все, ліпідів і мембранних структур. Оскільки між мембранами і іншими компонентами біологічних середовищ можуть здійснюватися міжмолекулярні взаємодії на основі гідрофобних, водневих і електростатичних взаємодій, тобто можуть формуватися надмолекулярних структури, які будуть впливати на електропровідність. В цьому відношенні можна вважати, що електропровідність біологічних середовищ є інтегральною характеристикою не тільки електролітного складу, а й мало досліджених структурних особливостей. Оцінка електропровідності культуральних середовищ може бути використана в клітинних біотехнологіях для оцінки кількості культуральних середовищ.

Досліджено електрофізичні параметри, склад та біологічну активність молозива і його компонентів. До складу молозива входить від 25 до 35 білків з молекулярними масами від 4800 до 9500 Да. Кількість, вміст і співвідношення між фракціями залежить від тварини.

Електропровідність молозива залежить від співвідношення компонентів, що входять до його складу (іонний, ліпідний і білковий компоненти), а також від продуцента молозива. Така індивідуальна особливість складу молозива відображає унікальність метаболізму особини.

В ході аналізу складу молозива методом мас-спектрометрії дозволило виявити кілька сот індивідуальних білків, які мають індивідуальний характер, що підтверджує факт унікальності цієї біологічної рідини.

Видалення високомолекулярних білків з молозива супроводжувалося значним збільшенням електропровідності (на 50-100%) і залежало від продуцента молозива. Побудована модель залежності між розміром білкової молекули і зарядом молекул вказує, що електропровідність залежить не тільки від заряду молекули, але і від її розміру і наявності факторів, що перешкоджають руху іонів і молекул в багатокомпонентних біологічних середовищах.

Електропровідність є перспективним методом оцінки якості продукції, яку отримують з молозива, при різних термінах зберігання на різних етапах виробництва: вихідна сировина, видалення жиру, отримання фракції з певним складом білків.

Між електропровідністю знежиреного молозива, низькомолекулярних компонентів молозива і концентраціями в вимірювальній комірці відсутня пряма залежність. Ця залежність є різною для молозива від різних тварин і відображає індивідуальні фізіолого-біохімічні особливості тварин.

Низькомолекулярні компоненти молозива здатні усувати токсичну дію сірчаноокислої міді на організм, механізми якого пов'язані з регулюванням прооксидантно-антиоксидантної системи, тобто зміщенням рівноваги в бік антиоксидантів.

Метод імпедансної спектроскопії можна використовувати для оцінки ступеня агрегації наночастинок у суспензії. Контроль стану суспензії є актуальною задачею у біотехнологіях та біомедицині.

Результати дозволяють зробити висновок, що імпедансна спектрометрія є зручним, швидким і адекватним методом оцінки якості молозива і його компонентів. Даний метод може бути використаний в технологіях отримання біологічно активних субстанцій з багатокомпонентних біологічних об'єктів.

Результати досліджень цього розділу наведено в публікаціях [13-22].

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі вирішено важливе наукове завдання: встановлено взаємозв'язок електропровідності, як біофізичної характеристики біологічних тканин і середовищ, з функціональним станом тканин на прикладі активності проліферації кісткового мозку в залежності від вікових характеристик та наявності фіброзу печінки і якісним та кількісним складом їх макромолекул (білків, ліпідів) на прикладі молозива та його компонентів.

1. Розроблено електромагнітні сенсори, які дозволяють, використовуючи метод широкосмугової імпедансної спектроскопії, проводити експрес-оцінку фізико-хімічних характеристик наночастинок, біологічних середовищ (молозива, середовищ для культивування клітин кісткового мозку, сироватки крові) та тканин.

2. Виявлено взаємозв'язок між проліферативною активністю клітин кісткового мозку в первинній структурі та електропровідністю клітинних суспензій. Запропоновано експрес-метод визначення проліферативної активності клітинних культур за зміненням їх електропровідності.

3. Встановлено, що електропровідність молозива та інших багатокомпонентних біологічних середовищ залежить не тільки від іонного складу, але і від співвідношення компонентів, що входять до їх складу, насамперед ліпідів та високомолекулярних білків (з молекулярною масою більше 10 кДа), тобто електропровідність є інтегральним показником структури та складу біологічних систем.

4. Експериментально показано та математично обґрунтовано, що видалення високомолекулярних білків (з молекулярною масою більше 10 кДа) сприяє значному збільшенню електропровідності, що свідчить про те, що залишкові низькомолекулярні білки (з молекулярною масою менше 10 кДа) забезпечують високий рівень електропровідності. Запропоновано метод оцінки терміну зберігання біологічних рідин (на прикладі молозива) за зміненням електропровідності.

5. Розроблено експрес-метод оцінки якості продуктів, отриманих із молозива (знежирене молозиво, низькомолекулярні компоненти молозива) на основі змінення їх електропровідності.

6. Показано, що низькомолекулярні компоненти молозива (молекулярна маса менше 10 кДа), які мають відносно високу електропровідність порівняно з високомолекулярними компонентами, проявляють антиоксидантні властивості та усувають токсичну дію сірчаної кислоти.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Bozhkov A. I., Ohienko S. L., Bondar A. Y., Klimova E. M., Ivanov E. G. Induced Liver Fibrosis Is Accompanied in Young and Old Animals by Age-Dependent Changes in Bone Marrow Cells // *Advances in Gerontology*. 2019. Vol. 9, N3. P.289–297.
2. Мирошниченко И. И., Птицина С. Н. Биомаркеры в современной медико-биологической практике // *Биомедицинская химия*. 2009. Т. 55, №4. С. 425-440.
3. Paniagua-Michel J., Olmos-Soto J. Modern approaches into biochemical and molecular biomarkers: key roles in environmental biotechnology // *J. Biotechnol. Biomater.* 2016. Т. 6, С. 1000216.
4. Ємельянов І. Г. Сучасні уявлення про рівні організації живого // Геоботанічні, ґрунтові та екологічні дослідження лісових біогеоценозів степової зони: історія, сучасність, перспективи: Матеріали Міжнародної науково-практичної конференції, присвяченої 90-річчю з дня народження чл.-кор. НАН України, д. б. н., професора АП Травлєєва, м. Дніпро: Ліра, 2019. С. 10.
5. Tavassoly I., Goldfarb J., Iyengar R. Systems biology primer: the basic methods and approaches // *Essays in biochemistry*. 2018. Vol. 62, N 4. P. 487–500.
6. Bechtel T. J., Weerapana, E. From structure to redox: The diverse functional roles of disulfides and implications in disease // *Proteomics*. 2017. Vol. 17, N 6. P. 1600391.
7. Yao J., Wang L., Liu K., Wu H., Wang H., Huang J., Li J. Evaluation of electrical characteristics of biological tissue with electrical impedance spectroscopy // *Electrophoresis*. 2020. Vol. 41, N 16-17. P. 1425-1432.
8. Barsoukov E., Macdonald J. R. Impedance spectroscopy: theory, experiment, and applications. Dallas: John Wiley & Sons, 2018. 560 p.
9. Council Directive on the approximation of laws, regulation and administrative provisions of the Member States regarding the protection of animals used for experimental and other scientific purposes // *Official Journal*. 1986. N 358. P. 0001-0028.

10. Amend S., Valkenburg K., Pienta K. Murine hind limb long bone dissection and bone marrow isolation // J. Visualized Exp. 2016. Vol. 2016. P. 12-22.
11. Asakawa T., Matsushita S. Coloring conditions of thiobarbituric acid test for detecting lipid hydroperoxides // Lipids. 1980. Vol. 15, N 3. P. 137-140.
12. Paglia D. E., Valentine W. N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase // The Journal of laboratory and clinical medicine. 1967. Vol. 70, N 1. P. 158-169.
13. Katrich V., Mustetsov N., Kozheshkurt V. Improvement of the model of temperature distribution and registration of native radiation of biological objects // Eastern-European Journal of Enterprise Technologies. 2017. Vol. 4, N 5. P. 10-16.
14. Kurselis K., Kozheshkurt V., Kiyan R., Chichkov B., Sajti L. Thermally assisted nanosecond laser generation of ferric nanoparticles // Applied Physics Letters. 2018. Vol. 112, N 11. P. 113103.
15. Антоненко Е. А., Кожешкурт В. А., Карпов А. И., Мустецов Н. П. Исследование возможностей метода коаксиального зонда для измерения дисперсии диэлектрической проницаемости биопроб // Прикладная радиоэлектроника: науч.-техн. журн. 2016. Т. 15, N 1. С. 51 - 56.
16. Антоненко Є. О., Кожешкурт В. О., Штода Д. О., Катрич В. О. Амплітудно-фазовий детектор для систем діелектричної спектроскопії // Радіофізика та електроніка. 2020. Т. 25, N 3. С. 68–77.
17. Антоненко Є. О., Кожешкурт В. О., Штода Д. О., Катрич В. О., Божков А. І. Електромагнітний сенсор для вимірювання діелектричної проникності матеріалів // Вісник Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна. Серія «Радіофізика та електроніка», 2020. Т. 32. С. 51 - 58.
18. Kozheshkurt V., Ivanov I., Antonenko Y., Katrich V., Bozhkov A., Gromovoy T. Devising an express method for estimating the quality of colostrum and its components based on electrical conductivity // Eastern-European Journal of Enterprise Technologies. 2021. Vol. 1, N 11 (109). P. 69 - 77.
19. Кожешкурт В. А., Антоненко Е. А. Исследование дисперсионной зависимости диэлектрической проницаемости биологических сред // Міжнародна

наукова конференція MicroCAD: Секція №15 - Застосування комп'ютерних технологій для вирішення наукових і соціальних проблем у медицині, 18-20 травня 2016. Харків: НТУ «ХПІ», 2016. С. 36.

20. Kozheshkurt V. A., Katrich V. A. Determining the Depth of the Temperature Anomalies in Biological Tissue // 8th International Conference on Ultrawideband and Ultrashort Impulse Signals (UWBUSIS), 5-11 September 2016. Odessa. 2016. P. 171-174.

21. Katrych V. O., Mustetsov M. P., Kozheshkurt V. O., Slipchenko O. V. Prospects for the use of nanoparticles in medicine // Функциональная база наноэлектроники: IX международная научная конференция. Сборник научных трудов, 18-23 сентября 2017. Одеса. 2017. С. 62-66.

22. Kozheshkurt V., Antonenko Ye., Shtoda D., Slipchenko O., Katrych V. Possibilities of Impedance Spectroscopy for the Study of Bioliquids // 9th International Conference on Ultrawideband and Ultrashort Impulse Signals (UWBUSIS), 4-7 September 2018. Odesa. 2018. P. 260-263.

23. Балыгин И. Е. Электрическая прочность жидких диэлектриков. Ленинград: Энергия, 1964. 277 с.

24. Адамчевский И. Электрическая проводимость жидких диэлектриков. Ленинград: Энергия, 1972. 296 с.

25. Gosse J. P. Electric conduction in dielectric liquids // The Liquid State and Its Electrical Properties. Springer, Boston, MA. 1988. P. 503-517.

26. Felici N. J. Conduction mechanisms in liquid dielectrics. Modern aspects // Proc. World Electrotechnical Congress. Moscow. 1977. P. 19.

27. Коробейников С. Электрофизические процессы в газообразных, жидких и твердых диэлектриках. Процессы в жидкостях. Новосибирск: Litres, 2018. 116 с.

28. Leys J., Wübbenhorst M., Preethy Menon C., Rajesh R., Thoen J., Glorieux C., Longuemart S. Temperature dependence of the electrical conductivity of imidazolium ionic liquids // The Journal of chemical physics. 2008. Vol. 128, N 6. P. 064509.

29. Inoue T., Ebina H., Dong B., Zheng L. Electrical conductivity study on micelle formation of long-chain imidazolium ionic liquids in aqueous solution // Journal of colloid and interface science. 2007. Vol. 314, N 1. P. 236-241.
30. Vila J., Gines P., Rilo E., Cabeza O., Varela L. M. Great increase of the electrical conductivity of ionic liquids in aqueous solutions // Fluid phase equilibria. 2006. Vol. 247, N 1-2. P. 32-39.
31. Stelwagen K., Carpenter E., Haigh B., Hodgkinson A., Wheeler T. T. Immune components of bovine colostrum and milk // Journal of animal science. 2009. N 87(suppl_13). P. 3-9.
32. Berkowitz M., Wan W. The limiting ionic conductivity of Na^+ and Cl^- ions in aqueous solutions: Molecular dynamics simulation // The Journal of chemical physics. 1987. Vol. 86, N 1. P. 376-382.
33. Жакин А. И. Ионная электропроводность и комплексообразование в жидких диэлектриках // Успехи физических наук. 2003. Т. 173, N 1. С. 51-68.
34. Miller J. J., Curtin D. Electrical conductivity and soluble ions. Soil sampling and methods of analysis. Boca Raton: Taylor & Francis Group LLC, 2006. 198 p.
35. Rhoades J. D., Raats P. A. C., Prather R. J. Effects of liquid-phase electrical conductivity, water content, and surface conductivity on bulk soil electrical conductivity // Soil Science Society of America Journal. 1976. Vol. 40, N 5. P. 651-655.
36. Сопин В. А., Тюркин В. С., Юшкова В. Б. Метод измерения удельной электропроводности жидкостей с использованием переходного процесса // Ползуновский альманах. 2016. N 2. С 197.
37. Первухин Б. С., Юшкова В. Б. Модернизация метода измерения удельной электропроводности жидкостей, воды и химических растворов // Ползуновский вестник. 2015. N 4. С. 95-98.
38. Зуев А. Л., Мишланов В. Ю., Судаков А. И., Шакиров Н. В. Автоматизированный приборный комплекс для измерения электрического импеданса биологических сред // Известия Юго-Западного государственного

университета. Сер.: Управление, вычислительная техника, информатика. Медицинское приборостроение. 2019. Т. 9, N 2. С. 6-21.

39. Николаев Д. В., Смирнов А. В., Бобринская И. Г., Руднев С. Г. Биоимпедансный анализ состава тела человека. Москва: Наука, 2009. 392 с.

40. Thomasset M. A. Bioelectric properties of tissue. Impedance measurement in clinical medicine. Significance of curves obtained // Lyon medical. 1962. Vol. 94. P. 107-118.

41. Piccoli A., Rossi B., Pillon L., Buccianti G. A new method for monitoring body fluid variation by bioimpedance analysis: the RXc graph // Kidney international. 1994. Vol. 46, N 2. P. 534-539.

42. Cornish B. Bioimpedance analysis: scientific background. // Lymphatic research and biology. 2006. Vol. 4, N 1. P. 47-50.

43. Киреев А. В. О нелинейной природе электрического импеданса биологических тканей // Известия Южного федерального университета. Технические науки. 2010. Т. 109, N 8. С/ 111-116.

44. Вавилов А. Ю., Халиков А. А., Ковалева М. С. Математическое моделирование электрических параметров биологической ткани при оценке ее повреждений методом импедансометрии // Проблемы экспертизы в медицине. 2006. Т 6. N 22-2. С. 34-37.

45. Бірта Г. О., Бургу Ю. Г. Вітчизняний та зарубіжний досвід управління якістю м'ясної продукції // Збірник праць ВНАУ. 2012. N 2. С. 50.

46. Власенко В. В., Блащук М. В., Палій Г. К., Блащук В. В. Визначення придатності агар-агару для приготування поживного середовища АПМ-вінтуб. // Biomedical and biosocial anthropology. 2014. N 23. С. 109.

47. Поливода В. В., Литвинчук Д. Г., Гавриленко В. О. Моделювання процесу вимірювання вологості в зерновій масі // Вісник Херсонського національного технічного університету. 2016. N 3. С. 388-392.

48. Власенко В. В., Головка М. П., Семко Т. В., Головка Т. М. Технологія молока та молочних продуктів: навчальний посібник. Харків: ХДУХТ, 2018. 202 с.

49. Крамаренко О. О. Біохімія молока і молочних продуктів: курс лекцій. Миколаїв: МНАУ, 2017. 96 с.
50. Славов В.П., Шубенко О.І., Ковальчук Т.І. Біохімія молока та молочних продуктів: Навчальний посібник. Житомир: Вид-во ЖДУ ім. І. Франка, 2013. 208 с.
51. Галушко І. А. Біологія продуктивності сільськогосподарських тварин: конспект лекцій з дисципліни для здобувачів вищої освіти ступеня «магістр» спеціальності «ТВППТ» денної та заочної форми навчання. Миколаїв: МНАУ, 2017. 163 с.
52. Sherbon J. W. Physical properties of milk // Fundamentals of dairy chemistry. Springer, Boston, MA. 1988. P. 409-460.
53. Зажарська Н. М., Костюченко К. Г., Кобелєв С. М. Визначення кількості соматичних клітин в овечому молоці різними методами // Науково-технічний бюлетень державного науково-дослідного контрольного інституту ветпрепаратів та кормових добавок і Інституту біології тварин. 2018. Т. 19, N 2. С. 109-116.
54. Zazharska N., Zharko L. Порівняння ефективності методів визначення кількості соматичних клітин козиного молока // Theoretical and Applied Veterinary Medicine. 2016. Vol. 4, N 4. P. 29-35.
55. Кирсанов В. В., Милешина О. В. Селективная технологическая линия доения с аналитическим блоком измерения и отделение аномального молока в потоке // Вестник НГИЭИ. 2012. N 10. С. 64-69.
56. Гончаренко І. В., Вінничук Д. Т. Технологічні аспекти роботизації молочних ферм // Науковий вісник Національного університету біоресурсів і природокористування України. Серія: Технологія виробництва і переробки продукції тваринництва. 2015. N 205. С. 264-273.
57. Кошевой В. П., Пастернак А. М. Мамологічна диспансеризація корів з використанням інформаційно-діагностичних приладів // Ветеринарна медицина України. 2013. N 4. С. 29-32.
58. Склярів П. М. Розробка методики мамологічної диспансеризації овець та кіз // Вісник Дніпропетровського державного аграрно-економічного університету. 2015. N 3. С. 130-132.

59. Зажарська Н. М., Костюченко К. Г., Білоголовська О. Ю. Вміст імуноглобулінів у овечому і козиному молозиві. Вісник ЖНАЕУ. Ветеринарна медицина. 2017. Т. 3, N 2(63). С. 88-93.
60. Maatje K. P. J. M., Huijsmans P. J. M., Rossing W., Hogewerf P. H. The efficacy of in-line measurement of quarter milk electrical conductivity, milk yield and milk temperature for the detection of clinical and subclinical mastitis // *Livestock production science*. 1992. Vol. 30, N 3. P. 239-249.
61. Norberg E., Hogeveen H., Korsgaard I. R., Friggens N. C., Sloth K. H. M. N., Løvendahl P. Electrical conductivity of milk: ability to predict mastitis status // *Journal of dairy science*. 2004. Vol. 87, N 4. P. 1099-1107.
62. Woolford M. W., Williamson J. H., Henderson H. V. Changes in electrical conductivity and somatic cell count between milk fractions from quarters subclinically infected with particular mastitis pathogens // *Journal of Dairy Research*. 1998. Vol. 65, N 2. P. 187-198.
63. Vilas Boas D. F., Vercesi Filho A. E., Pereira M. A., Roma Junior L. C., El Faro L. Association between electrical conductivity and milk production traits in Dairy Gyr cows // *Journal of Applied Animal Research*. 2017. Vol. 45, N 1. P. 227-233.
64. Zaninelli M., Rossi L., Tangorra F. M., Costa A., Agazzi A., Savoini G. On-line monitoring of milk electrical conductivity by fuzzy logic technology to characterise health status in dairy goats // *Italian Journal of Animal Science*. 2014. Vol. 13, N 2. P. 3170.
65. Romero G., Reinemann D., Alejandro M., Díaz J. R. Goat mastitis detection using daily records of milk conductivity: Comparative results of different algorithms // *Czech J. Anim. Sci.* 2014. Vol. 59, N 9. P. 428-434.
66. Antanaitis R., Žilaitis V., Kučinskas A., Juozaitienė V., Leonauskaitė K. Changes in cow activity, milk yield, and milk conductivity before clinical diagnosis of ketosis, and acidosis // *Veterinarija ir zootechnika*. 2015. Vol. 70, N 92. P. 3-9.
67. Лашко Н. П., Чаусовский Г. А., Литовченко А. М. Розробка методу експрес-тестування фальсифікації молока содою // Запорізького національного університету. 2008. N 2. С. 109-112.

68. Асташкина А. П., Яговкин А. Ю., Бакибаев А. А. Субстратный способ определения суммарной ферментативной активности дрожжей // Вестник Казанского технологического университета. 2009. N 2. С. 96-103.
69. Озерова Е. С., Константиновская С. В., Перов Ю. Ф. Электрические свойства клеток водоросли *Chlorella pyrenoidosa* // Вестн. РУДН. Сер. Экология и безопасность жизнедеятельности. 2005. N 1. С. 11.
70. Волкова Т. Н. Оценка зараженности зерна ячменя и солода плесневыми грибами // Пиво и напитки. 2010. N 2. С. 26-32.
71. Венгерович Н. Г., Антоненкова Е. В., Андреев В. А., Зайцева О. Б., Хрипунов А. К., Попов В. А. Новая питательная среда для культивирования *Medusomyces Gisevi* // Современные проблемы техники и технологии пищевых производств: материалы XIX международной научно-практической конференции. 22-23 марта 2018 г. Барнаул: Изд-во АлтГТУ. 2018. Т. 33, Ч. 1. С. 211.
72. Сиделев С. И., Бабаназарова О. В., Бараташвили Т. К., Мартьянов О. В. Экспериментальное изучение влияния добавок микробиологического препарата «Байкал ЭМ–1» на прудовой фитопланктон // Вестник Тверского государственного университета. Серия: Биология и экология. 2014. N 2. С. 96-110.
73. Андреев В. С. Возможная роль реструктуризации воды в слабых электрических полях при адаптации микроорганизмов к стрессовым воздействиям. URL: http://www.biophis.ru/active/congress_2012/proc-p118-d.pdf (дата звернения: 07.12.2020)
74. Роман Л. Ю., Чундак С. Ю. Синтез, структура, властивості та біологічна активність координаційних сполук Zn (II) та Cd (II) з гідразидом бензенової кислоти // Науковий вісник Ужгородського університету. Серія: Хімія. 2014. N 1. С. 31-39.
75. Сагитов Р. Ф., Коротков В. Г., Быков А. В., Попов В. П., Межуева Л. В. Электрофизический способ очистки сточных вод дрожжевых и хлебопекарных предприятий // Экология и промышленность России. 2017. Т. 21, N 9. С. 48-52.
76. Иголкин Б. И., Васильева Л. К., Васипов В. В., Ребане К. Ю., Мехтиев В. С. Электропроводность растительных масел в зависимости от

температуры и частоты электромагнитных колебаний // Научно-технические ведомости СПбПУ. Естественные и инженерные науки. 2011. Т. 2, N 123. С. 278-282.

77. Widegren J. A., Saurer E. M., Marsh K. N., Magee J. W. Electrolytic conductivity of four imidazolium-based room-temperature ionic liquids and the effect of a water impurity // The Journal of Chemical Thermodynamics. 2005. Vol. 37, N 6. P. 569-575.

78. Sarang S., Sastry S. K., Knipe L. Electrical conductivity of fruits and meats during ohmic heating // Journal of Food Engineering. 2008. Vol. 87, N 3. P. 351 - 356.

79. Trujillo M., Berjano E. Review of the mathematical functions used to model the temperature dependence of electrical and thermal conductivities of biological tissue in radiofrequency ablation // International Journal of Hyperthermia. 2013. Vol. 29, N 6. P. 590-597.

80. Podtaev S., Nikolaev D., Samartsev V., Gavrilov V., Tsiberkin K. Frequency and temperature dependence of skin bioimpedance during a contralateral cold test // Physiological measurement. 2015. Vol. 36, N 3. P. 561.

81. Dutz S., Hergt R. Magnetic nanoparticle heating and heat transfer on a microscale: Basic principles, realities and physical limitations of hyperthermia for tumour therapy // International Journal of Hyperthermia. 2013. Vol 29, N 8. P. 790-800.

82. Wang T., Zhao G., Liang X. M., Xu Y., Li Y., Tang H., Gao D. Numerical simulation of the effect of superparamagnetic nanoparticles on microwave rewarming of cryopreserved tissues // Cryobiology. 2014. Vol. 68, N 2. P. 234 - 243.

83. Esrick M. A., McRae D. A. The effect of hyperthermia-induced tissue conductivity changes on electrical impedance temperature mapping // Physics in Medicine & Biology. 1994. Vol.39, N 1. P. 133.

84. Ульберг З. Р., Грузина Т. Г., Духин А. С. Коллоидно-биохимический механизм взаимодействия клетки с микро-и наночастицами // Наносистемы, наноматеріали, нанотехнології. 2014. Т. 12, N 3. С. 417 - 450.

85. Петріна Р. О., Заярнюк Н. Л., Абушик О. С., Комаровська-Порохнявець О. З., Коліда С. С. Створення нових водних форм левоміцетину //

Вісник Національного університету «Львівська політехніка». 2007. N 590. С. 154-159.

86. Сибирцев В. С., Наумов И. А., Куприна Е. Э., Олехнович Р. О. Применение методики импедансного биотестирования для оценки действия фармацевтических соединений на рост микроорганизмов // Химико-фармацевтический журнал. 2016. Т 50, N 7. С. 51-55.

87. Сибирцев В. С., Красникова Л. В., Шлейкин А. Г., Строев С. А., Наумов И. А., Олехнович Р. О., Аль-Хатиб М. Новый метод биотестирования с применением современных импедансных технологий // Научно-технический вестник информационных технологий, механики и оптики. 2015. Т. 15, N 2. С. 275-284.

88. Kushniryk O. V., Marchenko M. M., Khudyi O. I., Vasina L. M., Khuda L. V., Kavulya O. M. Застосування каротинсинтезуючих дріжджів *Rhodotorula Glutinis* для культивування *Simoserphalus Vetulus* (Müller, 1776) у лабораторних умовах // Науковий вісник Чернівецького університету. Біологія (Біологічні системи). 2014. Т. 6, N 1. С. 24-29.

89. Thrivikraman G., Mallik P. K., Basu B. Substrate conductivity dependent modulation of cell proliferation and differentiation in vitro // Biomaterials. 2013. Vol. 34, N 29. P. 7073-7085.

90. Pradhan R., Rajput S., Mandal M., Mitra A., Das S. Electric cell-substrate impedance sensing technique to monitor cellular behaviours of cancer cells // RSC Advances. 2014. Vol. 4, N 19. P. 9432-9438.

91. Варнакова Е. С., Гурьева В. А. Особенности диагностики внутрипротоковой патологии молочной железы с применением современных методов // Современные проблемы науки и образования. 2012. N 4. С. 78.

92. Спосіб оцінки міцності післяопераційного рубця в експерименті: пат. 5394 Україна. № 20040503347; заявл. 05.05.2004; опубл. 15.03.2005, Бюл. №3. 2 с.

93. Petchakup C., Li K. H. H., Hou H. W. Advances in single cell impedance cytometry for biomedical applications // Micromachines. 2017. Vol 8, N 3. P. 87.

94. Кувачева Н. В., Моргун А. В., Хилажева Е. Д., Малиновская Н. А., Горина Я. В., Пожиленкова Е. А., Салмина А. Б. Формирование инфламмасом: новые механизмы регуляции межклеточных взаимодействий и секреторной активности клеток // Сибирское медицинское обозрение. 2013. N 5. С. 3-10.
95. Молокова К. В., Привалова Е. А., Адамович С. Н., Мирскова А. Н., Мирсков Р. Г. Влияние протонных ионных жидкостей на бродильную активность спиртовых дрожжей // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2014. Т. 1, N 6. С. 70-73.
96. Горностаева Е. А. Влияние ионов меди и никеля на почвенные цианобактерии и цианобактериальные сообщества: автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.02.03. Москва, 2015. 26 с.
97. Ильющик И. А., Жук О. Н., Никандров В. Н. Влияние ионов марганца (II) на рост и казеинолитическую активность микроводоросли *Scenedesmus esornis* // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем : международная научная конференция; XII съезд Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков.: Минск, 2016. С. 161-164.
98. Гривенникова В. Г., Виноградов А. Д. Генерация активных форм кислорода митохондриями // Успехи биологической химии. 2013. Т. 53, N 12. С. 245-296.
99. Bozhkov A. I., Nikitchenko Yu.V. Caloric Restriction Diet Induces Specific Epigenotypes Associated with Life Span Extension // Journal of Nutritional Therapeutics. 2013. N 2. P. 30-39.
100. Bozhkov A. I., Nikitchenko Yu. V., Klimova E. M., Linkevych O. S., Lebid K. M., Al-Bahadli A. M. M., Alsardia M. M. A. Young and Old Rats Have Different Strategies of Metabolic Adaptation to Cu-Induced Liver Fibrosis// Advances in Gerontology. 2017. Vol. 7, N 1. P. 41–50.
101. Bozhkov A. I., Ivanov E. G., Kuznetsova Y. A., Ohiienko S. L., Bondar A. Y. Copper-induced liver fibrosis affects the behavior of bone marrow cells in primary culture // Frontiers in biology. 2017. Vol. 12, N 4. P. 271-279.

102. Lewandowski K., Kowalik M. M., Pawlaczyk R., Rogowski J., Hellmann A. Microscopic examination of bone marrow aspirate in healthy adults—comparison of two techniques of slide preparation // International journal of laboratory hematology. 2012. Vol 34, N 3. P. 254-261.
103. Cellular ROS Assay Kit-Red (ab186027), Protocol Booklet, Abcam, 2018. P. 2-9.
URL: [https://www.abcam.com/ps/products/186/ab186027/documents/ab186027%20Cellular%20Reactive%20Oxygen%20Species%20Detection%20Assay%20Kit%20Red%20Fluorescence%20protocol%20v3d%20\(website\).pdf](https://www.abcam.com/ps/products/186/ab186027/documents/ab186027%20Cellular%20Reactive%20Oxygen%20Species%20Detection%20Assay%20Kit%20Red%20Fluorescence%20protocol%20v3d%20(website).pdf) (дата звернення: 27.10.2020).
104. Potts W. T. W., Parry G. Osmotic and Ionic Regulation in Animals. International Series of Monographs on Pure and Applied Biology. London: Oxford, 1964. 423 p.
105. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. 1951. Vol. 193. P. 265–275.
106. Svacina J. Analysis of multilayer microstrip lines by a conformal mapping method // IEEE Trans. Microwave Theory Tech. 1992. Vol. 40. P. 769–772.
107. Svacina J. A simple quasi-static determination of basic parameters of multilayer microstrip and coplanar waveguide // IEEE Microw. Guided Wave Lett. 1992. Vol. 2. P. 385–387.
108. Otto G. P., Chew W. C. Improved Calibration of a Large OpenEnded Coaxial Probe for Dielectric Measurements // IEEE Transactions on Instrumentation and Measurement. 1991. N 4. P. 742–746.
109. Jilani M. T., Rehman M. Z., A. M. Khan Brief Review of Measuring Techniques for Characterization of Dielectric Materials // International Journal of Information Technology and Electrical Engineering. 2012. N 1. P. 1–5.
110. Santos J. C., Dias M. H., Aguiar A. P. Using the Coaxial Probe Method for Permittivity Measurements of Liquids at High Temperatures // Journal of Microwaves, Optoelectronics and Electromagnetic Applications. 2009. N 1. P. 78S–91S.

111. Lasitter H. A. Power Line Impedance Determination Using the "3 Voltmeter" Measurement Method // 1969 IEEE Electromagnetic Compatibility Symposium Record. 1969. P. 128-136.
112. Marzetta L. A. An evaluation of the three-voltmeter method for AC power measurement // IEEE Transactions on Instrumentation and Measurement. 1972. Vol. 21, N 4. P. 353-357.
113. Zekry A., Ibrahim A., Atallah A., Abouelatta M., Shaker A. Four voltmeter vector impedance meter based on virtual instrumentation // MAPAN. 2016. Vol. 31, N 3. P. 159-167.
114. Ebrahimi A, Scott J, Ghorbani K. Dual-mode resonator for simultaneous permittivity and thickness measurement of dielectrics // IEEE Sensors Journal. 2019. Vol. 20, N 1. P. 185-92.
115. Semerok A., Chaléard C., Detalle V., Lacour J. L., Mauchien P., Meynadier P., Petite G. Experimental investigations of laser ablation efficiency of pure metals with femto, pico and nanosecond pulses // Applied Surface Science. 1999. Vol. 138. P. 311-314.
116. Sajti C. L., Sattari R., Chichkov B. N., Barcikowski S. Gram scale synthesis of pure ceramic nanoparticles by laser ablation in liquid // The Journal of Physical Chemistry C. 2010. Vol. 114, N 6. P. 2421-2427.
117. Liang Y., Liu P., Yang G. Fabrication of one-dimensional chain of iron-based bimetallic alloying nanoparticles with unique magnetizations // Crystal growth & design. 2014. Vol. 14, N 1. P. 5847-5855.
118. Grosvenor A. P., Kobe B. A., McIntyre N. S. Examination of the oxidation of iron by oxygen using X-ray photoelectron spectroscopy and QUASESTM // Surface science. 2004. Vol. 565, N 2-3. P. 151-162.
119. Roosendaal S. J., Vredenberg A. M., Habraken F. H. P. M. Oxidation of iron: the relation between oxidation kinetics and oxide electronic structure // Physical review letters. 2000. Vol. 84, N 15. P. 3366.

120. Leibbrandt G. W. R., Spiekman L. H., Habraken F. H. P. M. Temperature dependence of thin oxide film growth on Fe (110) // Surface science. 1993. Vol. 287. P. 245-249.
121. Fisker R., Carstensen J. M., Hansen M. F., Bødker F., Mørup S. Estimation of nanoparticle size distributions by image analysis // Journal of Nanoparticle Research. 2000. Vol. 2, N 3. P. 267-277.
122. Вайсблат А. В. Радиотермография как метод диагностики в медицине. Москва: ИЦЗД РАМН, 2003. 80 с.
123. Тамм И. Е. Основы теории электричества: Учеб. пособие для вузов. 11-е изд., испр. и доп. Москва: Физматлит, 2003. 616 с.
124. Rosenfeld L.G., Samokhin A.V., Venger E.F., Loboda T.V., Kolotilov N.N., Kollyukh A.G., Dunayevsky V.I. Remote infra-red thermography as modern non-invasive method of diseases diagnostics // Ukrainian Medical Journal. 2008. Vol. 6, N 68(XI–XII). P. 92–97.
125. DeWitt D. P., Nutter G. D. Theory and Practice of Radiation Thermometry. New York: John Wiley and Sons, Inc, 1988. 1138 p.
126. Троицкий В. С., Аранжереев В. А., Густов А. В. Измерение глубинного температурного профиля биообъектов по их собственному тепловому радиоизлучению // Изв. ВУЗов. Радиофизика. 1986. Т. 5, N 1. С. 62–68.
127. Гайкович К. П., Сумин М. И., Троицкий Р. В. Определение глубинного профиля температуры методом многочастотной радиотермографии в медицинских приложениях // Изв. ВУЗов. Радиофизика. 1988. Т. 31, N 9. С. 1104–1112.
128. Tahir H. S., Siores E., Daskalakis C. Non-Invasive Devices for Early Detection of Breast Tissue Oncological Abnormalities Using Microwave Radio Thermometry // Advances in Cancer Therapy. InTech, 2011. 568 p.
129. Afyf A., Bellarbi L., Achour A., Yaakoubi N., Errachid A., Sennouni M. A. UWB thin film flexible antenna for microwave thermography for breast cancer detection // International Conference on Electrical and Information Technologies (ICEIT): Tangier, 2016. P. 425–429.

130. Wang L., Simpkin R., Al-Jumaily A. M. Open-ended waveguide antenna for microwave breast cancer detection // IEEE International Workshop on Electromagnetics (iWEM): Hong Kong, 2013. P. 65–68.
131. Stec B., Dobrowolski A, Susek W. Multifrequency microwave thermograph for biomedical applications // Journal of Telecommunications and Information Technology. 2004. N 1. P. 117–122.
132. Седельников Ю. Е., Потапова О. В. Сфокусированные антенны в задачах медицинской радиотермометрии // Инженерный журнал: наука и инновации. 2014. Т. 2. С. 1–12.
133. Веснин С. Г., Седанкин М. К. Сравнение микроволновых антенн-аппликаторов медицинского назначения // Биомедицинская радиоэлектроника. 2012. N 10. С. 63–74.
134. Bozhkov A. I., Nikitchenko Y. V., Lebid K. M., Ivanov E. G., Kurguzova N. I., Gayevoy S. S., Al Begai M. A. Y. Low molecular weight components from various sources eliminate oxidative stress and restore physiological characteristic of animals at early stages of Cu-induced liver fibrosis development // Translational Biomedicine. 2017. Vol. 8, N 2. P. 22–32.
135. Potts W. T. W., Parry G. Osmotic and Ionic Regulation in Animals: International Series of Monographs on Pure and Applied Biology. Cambridge: Elsevier, 2016. 438 p.
136. Ryu H. W., Lee D. H., Won H. R., Kim K. H., Seong Y. J., Kwon S. H. Influence of toxicologically relevant metals on human epigenetic regulation // Toxicological research. 2015. Vol. 31. P. 1-9.
137. Blajszczak C., Bonini M. G. Mitochondria targeting by environmental stressors: implications for redox cellular signaling // Toxicology. 2017. Vol. 391. P. 84 - 89.
138. Becker F. F., Wang X. B., Huang Y., Pethig R., Vykoukal J., Gascoyne P. R. Separation of human breast cancer cells from blood by differential dielectric affinity // Proceedings of the National Academy of Sciences. 1995. Vol. 92, N 3. P. 860-864.

139. Bozhkov A., Padalko V., Dlubovskaya V., Menzyanova N. Resistance to heavy metal toxicity in organisms under cronic exposure // *Indian Journal of Experimental Biology*. 2010. Vol. 48. P. 679-696.
140. Li M., Li Q., Kang S., Cao X., Zheng Y., Wu J., Yue X. Characterization and comparison of lipids in bovine colostrum and mature milk based on UHPLC-QTOF-MS lipidomics // *Food Research International*. 2020. Vol. 136. P. 109490.
141. McGrath B. A., Fox P. F., McSweeney P. L., Kelly A. L. Composition and properties of bovine colostrum: a review // *Dairy Science & Technology*. 2016. Vol. 96. N 2. P. 133-158.
142. Borad S. G., Singh, A. K. Colostrum immunoglobulins: Processing, preservation and application aspects // *International Dairy Journal*. 2018. Vol. 85. P. 201 - 210.
143. Hyrslova I., Krausova G., Michlova T., Kana A., Curda L. Fermentation Ability of Bovine Colostrum by Different Probiotic Strains // *Fermentation*. 2020. Vol. 6, N 3. P. 93.
144. Callahan G. N., Yates R. M., Warren A. L. *Basic veterinary immunology*. Boulder: University Press of Colorado, 2014. 337 p.
145. Pithua P., Aly S. S. A cohort study of the association between serum immunoglobulin G concentration and preweaning health, growth, and survival in Holstein calves // *Int J Appl Res Vet M*. 2013. Vol. 11. P. 77-84.
146. Gramse G., Dols-Perez A., Edwards M. A., Fumagalli L., Gomila G. Nanoscale Measurement of the Dielectric Constant of Supported Lipid Bilayers in Aqueous Solutions with Electrostatic Force Microscopy // *Biophysical Journal*. 2013. Vol. 104, N 6. P. 1257-1262.
147. Gómez Vera J., Chávez Sánchez R., Flores Sandoval G., Orea Solano M., López Tiro J. J., Santiago Santos A. D., Barrientos Zamudio J. Transfer factor and allergy // *Revista Alergia de Mexico*. 2010. Vol. 57, N 6. P. 208-2014.
148. Rozzo S. J., Kirkpatrick Ch. H. Purification of transfer factors // *Molecular Immunology*. 1992. Vol. 29, N 2. P. 167-182.

149. Sánchez – González D. J., Sosa – Luna C. A., Vásquez – Moctezuma I. Factores de transferencia en la terapéutica médica. Transfer factors in medical therapy // *Medicina Clínica*. 2011. Vol. 137, N 6. P. 273-277.
150. Qian X., Gu N., Cheng Z., Yang X., Wang E., Dong S. Methods to study the ionic conductivity of polymeric electrolytes using ac impedance spectroscopy // *Journal of Solid State Electrochemistry*. 2001. Vol. 6, N 1. P. 8-15.
151. D'Amici G. M., Rinalducci S., Zolla L. Proteomic analysis of RBC membrane protein degradation during blood storage // *Journal of proteome research* 2007. Vol. 6, N 8. P. 3242-3255.
152. Koletzko B., Chourdakis M., Grote V., Hellmuth C., Prell C., Rzehak P., Weber M. Regulation of early human growth: impact on long-term health // *Annals of Nutrition and Metabolism*. 2014. Vol. 65, N 2-3. P. 101-109.
153. Brands B., Demmelmair H., Koletzko B., EarlyNutrition Project. How growth due to infant nutrition influences obesity and later disease risk // *Acta paediatrica*. 2014. Vol. 103, N 6. P. 578-585.
154. Bozhkov A. I., Nikitchenko Yu. V., Al-Bahadly Ali M. M. Overeating in early postnatal ontogenesis forms metabolic memory and reduces lifespan // *J Gerontol Geriatr Res*. 2016. Vol. 5, N 309. P. 2.
155. Baintner K. Transmission of antibodies from mother to young: Evolutionary strategies in a proteolytic environment // *Veterinary immunology and immunopathology*. 2007. Vol. 117, N 3-4. P. 153-161.
156. Devillers N., Le Dividich J., Prunier A. Influence of colostrum intake on piglet survival and immunity // *Animal*. 2011. Vol. 5, N 10. P. 1605-1612.
157. Elfstrand L., Lindmark-Månsson H., Paulsson M., Nyberg L., Åkesson B. Immunoglobulins, growth factors and growth hormone in bovine colostrum and the effects of processing // *International Dairy Journal*. 2002. Vol. 12, N 11. P. 879-887.
158. Miciński J., Pogorzelska J., Beisenov A., Aitzhanova I., Shaikamal G., Dzięgelewska-Kuźmińska D., Sobczuk-Szul M. Basic and mineral composition of colostrum from cows in different ages and calving period // *Journal of Elementology*. 2017. Vol. 22, N 1. P. 259-269.

159. Bozhkov A. I., Linkevych O. S., Ivanov E. G., Klimova O. M., Al Begai M. A. Y. Low molecular weight components of colostrum regulate the activity of cellular component of the immune system in animals with Cu-induced liver fibrosis // International Journal of Current Research. 2016. Vol. 8, N 12. P. 44129-44137.
160. Contarini G., Povolò M., Pelizzola V., Monti L., Bruni A., Passolungo L., Degano L. Bovine colostrum: Changes in lipid constituents in the first 5 days after parturition // Journal of Dairy Science. 2014. Vol. 97, N 8. P. 5065-5072.
161. Coroian A., Erler S., Matea C. T., Mireşan V., Răducu C., Bele C., Coroian C. O. Seasonal changes of buffalo colostrum: physicochemical parameters, fatty acids and cholesterol variation // Chemistry Central Journal. 2013. Vol 7, N 1. P. 1-9.
162. Wang J., He Y., Pang K., Zeng Q., Zhang X., Ren F., Guo H. Changes in milk yield and composition of colostrum and regular milk from four buffalo breeds in China during lactation // Journal of the Science of Food and Agriculture. 2019. Vol. 99, N 13. P. 5799-5807.

ДОДАТОК 1

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові праці, в яких опубліковано основні наукові результати дисертації.

Наукові праці в зарубіжних спеціалізованих виданнях, що входять до міжнародної наукометричної бази Scopus

1. Katrich V., Mustetsov N., **Kozheshkurt V.** Improvement of the model of temperature distribution and registration of native radiation of biological objects // Eastern-European Journal of Enterprise Technologies. 2017. Vol. 4, N 5. P. 10-16. *(Особистий внесок здобувача: розробка математичної моделі розподілу температури, розробка математичної моделі реєстрації власного електромагнітного випромінювання біологічних тканин, графічне представлення результатів, участь у обговоренні, переклад на англійську мову)*
2. Kurselis K., **Kozheshkurt V.**, Kiyan R., Chichkov B., Sajti L. Thermally assisted nanosecond laser generation of ferric nanoparticles //Applied Physics Letters. 2018. Vol. 112, N 11. P. 113103. *(Особистий внесок здобувача: розробка експериментальної установки для нагрівання мішені, виконання експериментальної роботи, математична обробка отриманих даних, участь у обговоренні)*

Наукові праці в наукових фахових виданнях України

3. Антоненко Е. А., **Кожешкурт В. А.**, Карпов А. И., Мустецов Н. П. Исследование возможностей метода коаксиального зонда для измерения дисперсии диэлектрической проницаемости биопроб // Прикладная радиоэлектроника: науч.-техн. журн. 2016. Т. 15, № 1. С. 51–56. *(Особистий внесок здобувача: виконано математичну обробку отриманих експериментальних даних з параметрів біологічних тканин та фізіологічних рідин, участь у обговоренні)*

4. Антоненко Є. О., **Кожешкурт В. О.**, Штода Д. О., Катрич В. О. Амплітудно-фазовий детектор для систем діелектричної спектроскопії // Радіофізика та електроніка. 2020. Т. 25, № 3. С. 68–77. *(Особистий внесок здобувача: виконання експериментальної роботи з вимірювання параметрів детектора, участь у обговоренні результатів)*

5. Антоненко Є. О., **Кожешкурт В. О.**, Штода Д. О., Катрич В. О., Божков А. І. Електромагнітний сенсор для вимірювання діелектричної проникності матеріалів // Вісник Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна. Серія «Радіофізика та електроніка», 2020. випуск 32. С. 51-58. *(Особистий внесок здобувача: виконання експериментальної роботи з дослідження за допомогою розробленого резонатора твердих діелектриків та біологічних рідин, участь у обговоренні результатів)*

Наукові праці, які додатково відображають наукові результати дисертації:

6. **Kozheshkurt V.**, Ivanov I., Antonenko Y., Katrich V., Bozhkov A., Gromovoy T. Devising an express method for estimating the quality of colostrum and its components based on electrical conductivity // Eastern-European Journal of Enterprise Technologies. 2021. Vol. 1, N 11 (109). P. 69-77. (Scopus) *(Особистий внесок здобувача: виконання експериментальної роботи, виконано математичну обробку отриманих даних, участь у обговоренні)*

Наукові праці апробаційного характеру (тези доповідей на наукових конференціях) за темою дисертації

7. **Кожешкурт В. А.**, Антоненко Е. А. Исследование дисперсионной зависимости диэлектрической проницаемости биологических сред // Міжнародна наукова конференція MicroCAD: Секція №15 - Застосування комп'ютерних технологій для вирішення наукових і соціальних проблем у медицині, 18-20 травня 2016.: Харків, НТУ «ХПІ», 2016. С. 36. *(Особистий внесок здобувача: виконання*

експериментальної роботи, участь у математичній обробці отриманих даних, участь у обговоренні результатів, участь у написанні тез, доповідь на конференції)

8. **Kozheshkurt V. A.**, Katrich V. A. Determining the Depth of the Temperature Anomalies in Biological Tissue // 8th International Conference on Ultrawideband and Ultrashort Impulse Signals (UWBUSIS), 5-11 September 2016.: Odessa, 2016. P. 171-174. (Scopus). *(Особистий внесок здобувача: виконання експериментальної роботи, побудовано математичну модель розподілу температури при температурної аномалії, виконано графічну обробку отриманих результатів розрахунків, участь у обговоренні результатів, написання тез, доповідь на конференції)*

9. Katrych V. O., Mustetsov M. P., **Kozheshkurt V. O.**, Slipchenko O. V. Prospects for the use of nanoparticles in medicine // Функциональная база нанoeлектроники : IX международная научная конференция. Сборник научных трудов, 18-23 вересня 2017.: Одеса, 2017. С. 62-66. *(Особистий внесок здобувача: виконання огляду літературних джерел за темою оглядової доповіді, участь у обговоренні результатів, написання тез, доповідь на конференції)*

10. **Kozheshkurt V.**, Antonenko Ye., Shtoda D., Slipchenko O., Katrych V. Possibilities of Impedance Spectroscopy for the Study of Bioliquids // 9th International Conference on Ultrawideband and Ultrashort Impulse Signals (UWBUSIS), 4-7 September 2018.: Odesa. 2018. P. 260-263. (Scopus). *(Особистий внесок здобувача: виконання експериментальної роботи, участь у обговоренні результатів, участь у написанні тез, доповідь на конференції)*