

Aleksandra KŁOS-WITKOWSKA<sup>1</sup>, Vasył MARTSENYUK<sup>2</sup>

## **PORÓWNANIE EFEKTYWNOŚCI METOD BADAWCZYCH NA PODSTAWIE STABILNOŚCI KOMPLEKSÓW BSA -AU PODDANYCH DZIAŁANIU POLA ELEKTROMAGNETYCZNEGO**

**Streszczenie:** W poniższej pracy przedstawiono porównanie efektywności metod badawczych na podstawie badań stabilności BSA-Au poddanych działaniu pola elektromagnetycznego. Zbadano zmiany konformacyjne zachodzące w wybranych substancjach wraz z czasem za pomocą: spektroskopii UV-Vis, zmian w przewodności oraz zmian w skanach dystrybucji pola elektromagnetycznego. Wyłoniono najbardziej odpowiednią metodę badawczą.

**Słowa kluczowe:** BSA-Au, UV-Vis, przewodność, pole elektromagnetyczne

## **COMPARISON OF THE EFFECTIVENESS OF TEST METHODS BASED ON STABILITY OF BSA-AU COMPLEXES SUBJECTED TO ELECTROMAGNETIC FIELDS**

**Summary:** The following paper presents a comparison of the effectiveness of test methods based on stability studies of BSA-Au subjected to an electromagnetic field. The conformational changes occurring in the selected substances with time were investigated by means of: UV-Vis spectroscopy, changes in conductivity and changes in electromagnetic field distribution scans. The most appropriate research method was selected

**Keywords:** BSA-Au, UV-Vis, conductivity, electromagnetic field

### **1. Wstęp**

Badania stabilności komponentów warstw receptorowych biosensorów oraz ich kompleksów na przestrzeni ostatnich lat bardzo intensywnie się rozwijają z uwagi na konieczność wydłużenia czasu użyteczności tego typu urządzeń [1-3]. Powszechnie prowadzone badania rozwijają się w dwóch niezależnych nurtach: teoretycznym wykorzystujących modelowanie matematyczne i sztuczną inteligencję [4-5] oraz doświadczalnym, gdzie w sposób empiryczny prowadzi się badania nad poprawą

---

<sup>1</sup> dr, Uniwersytet Bielsko-Bialski, Wydział Budowy Maszyn i Informatyki, email :awitkowska@ubb.edu.pl

<sup>2</sup> prof. dr hab, Uniwersytet Bielsko-Bialski, Wydział Budowy Maszyn i Informatyki, email: vmartsenyuk@ubb.edu.p

stabilności komponentów warstw receptorowych i ich kompleksów pod wpływem czynników zewnętrznych [6-7].

Stosowane jest wiele różnorodnych metod badawczych w celu uzyskania jak najszerszego obrazu zmian zachodzących w proteinach warstw receptorowych i ich kompleksach. Wśród nich można wyróżnić : spektrofotometrię, dychromizm kołowy, spektrofotometrię [8-10].

Dążąc do pozyskania jeszcze szerszego spektrum informacji na temat stabilności poszukuje się coraz to bardziej nowoczesnych metod badawczych lub próbuje się aplikować metody badawcze pierwotnie przeznaczone do innego typu badań [11]. W prezentowanej pracy na podstawie danych pomiarowych oraz czasu przeprowadzania pomiarów zbadano efektywność metod pod kątem dokładności i jakości uzyskanych informacji oraz pod kątem czasu potrzebnego na wykonywanie eksperymentów.

Zbadano stabilność kompleksów białkowych BSA-Au eksponowanych na pole elektromagnetyczne. Eksperymenty wykonano za pomocą trzech wybranych metod badawczych: spektroskopii UV-Vis, zmian w przewodności oraz zmian w dystrybucji pola elektromagnetycznego.

## **2. Materiały i Metody**

Proces denaturacji kompleksów komponenta warstw receptorowych biosensora został zbadany za pomocą trzech metod: spektroskopii UV-Vis, zmian przewodności oraz zmian dystrybucji pola elektromagnetycznego.

Badania przeprowadzono dla wodnych roztworów kompleksów BSA-Au biorąc pod uwagę doniesienia naukowe [12], że roztwór wodny pozwala lepiej poznać właściwości fizykochemiczne badanych substancji. Przygotowane roztwory w pierwszym dniu eksperymentu poddano ekspozycji na pole elektromagnetyczne o zakresie mikrofalowym. Ekspozycji dokonano w czasie 15s w trybie ciągłym. Krótki czas napromieniania pozwolił na zbadanie zmian nietermicznych w roztworach.

Następnie w kolejnych dniach: 1, 3, 4, 11, 15, 18 śledzono zmiany denaturacyjne zachodzące w kompleksach przy użyciu 3 metod badawczych. Kolejno na podstawie danych eksperymentalnych porównano wyniki. Dokonano również porównania efektywności metod badawczych pod kontem jakości otrzymanych danych, czasu trwania pomiaru, stopnia trudności w przeprowadzaniu analizy.

### **2.1. Metoda spektroskopii UV -Vis**

Spektroskopia UV-VIS jest wykorzystywana w badaniach struktury związków organicznych, jest powszechnie stosowana do ilościowego oznaczania różnych związków. Jest również wykorzystywana do śledzenia zmian konformacyjnych w białkach [13]. Na podstawie analizy absorpcji promieniowania o określonej długości fali, przy użyciu spektrogramów, możliwe jest śledzenie zmian aktywności związków chemicznych, w tym także białek. Dwa parametry widoczne w widmie są powszechnie wykorzystywane do celów analitycznych. Pierwszym z nich jest absorpcja promieniowania, a drugim długość fali. Znane są metody analizy oparte na maksimum absorpcji przy określonej długości fali [14], a także metoda [15]

z wykorzystaniem maksimum absorpcji ( $A_{max}$ ) występującego przy określonej długości fali (piki w widmie) z minimum absorpcji przy określonej długości fali ( $A_{min}$ ). Na podstawie analizy uzyskanego parametru  $A_{max}/A_{min}$ , poprzez wyznaczenie funkcji fitującej (dopasowanej do zmian czasowych), dokonuje się określenia parametru „a”. Na jego podstawie wnioskuje się o zmianach konformacyjnych zachodzących w badanych substancjach wraz z upływem czasu i pod wpływem czynnika [16].

W przeprowadzonych badaniach badano kompleksy białkowe używając dwuwiązkowego spektrofotometru UV-Vis (Halo DB-20R) Dynamica, Zbadano widma absorpcyjne wodnych roztworów BSA-Au w zakresie (250-320nm) dla próbek kontrolnych oraz próbek promieniowanych. Zakres ten został dobrany w taki sposób, aby śledzić zmiany piku absorpcyjnego  $\lambda_{max}=277$  nm pochodzącego od występujących w białku aminokwasów aromatycznych takich jak tryptofan (Trp), tyrozyna (Tyr) i fenyloalanina (Phe).

## 2.2. Metoda zmian przewodności

Badania zmian przewodności pod wpływem czynników wykonano za pomocą specjalnie skonstruowanego stanowiska pomiarowego zawierającego: konduktometr firmy Elmetron, model CC-401 wraz z sondą, stojak, umożliwiający pomiar przewodności roztworu zawsze na tej samej głębokości zanurzenia sondy oraz komputer.

W doświadczeniu wykonano pomiar przewodności dla roztworów BSA-Au dla próbek kontrolnych oraz próbek poddanych ekspozycji na czynnik zewnętrznych. Temperatura w czasie trwania eksperymentu była stale monitorowana. Była stała i wynosiła 22°C. Wartość przewodności określono się na podstawie 20 pomiarów. Sygnał był próbkowany co 2 sekundy. Przeprowadzoną analizę wykonano na podstawie średniej przewodności wyznaczonej z 20 zebranych pomiarów.

## 2.3. Zmiany dystrybucji pola elektromagnetycznego poprzez analizę skanów

Badania dystrybucji pola elektromagnetycznego po przejściu przez roztwory wykonano za pomocą specjalnie skonstruowanego stanowiska pomiarowego zawierającego: źródło pola elektromagnetycznego, analizator widma z sondą pola bliskiego, skaner pola elektromagnetycznego model RSE321 firmy ASTAT, komputer oraz zestaw próbek. Próbkami były wodne roztwory BSA-Au (próbki kontrolne oraz próbki poddanych ekspozycji na czynnik zewnętrzny). Zmiany dystrybucji pola elektromagnetycznego były badane po przejściu przez substancje oraz dla porównania przez warstwy wody i powietrza. Na podstawie otrzymanych skanów dystrybucji za pomocą specjalistycznego oprogramowania skanera określono wartość maksymalną i minimalną amplitudy pola elektromagnetycznego w skanowanym obszarze. Na tej podstawie dokonano analizy porównawczej dystrybucji pola elektromagnetycznego dla próbek promieniowanych i kontrolnych. Skany wykonywano 1, 3, 4, 11, 15, 18 dniu eksperymentu.

### 3. Rezultaty i dyskusja

#### 3.1. Porównanie metod badawczych

Tabela 1 przedstawia porównanie wybranych metod badawczych takich jak : metoda UV -VIS, zmiana przewodności, zmiana dystrybucji pola elektromagnetycznego pod kątem sposobu wykonania eksperymentu. (pozyskanie danych), czasu wykonania pomiaru sposobu ich analizy. Zasadniczo metody te różniły się rodzajem mierzonych parametrów fizycznych. W przypadku spektroskopii UV-VIS pozyskiwane dane ( $A_{min}$ ,  $A_{max}$ ) to parametry absorpcji przy określonej długości fali (dla przeprowadzonych badań było to  $\lambda=251\text{nm}$  i  $\lambda=277\text{nm}$ ), dla zmiany przewodności parametrem będącym podstawą analiz była wartość przewodności, natomiast dla zmian dystrybucji pola elektromagnetycznego parametrem była maksymalna i minimalna ( $A_{min}$ ,  $A_{max}$ ) wartość amplitudy pola elektromagnetycznego. Czas pojedynczego pomiaru w przypadku spektroskopii UV-VIS (w wybranym zakresie) oraz pomiaru przewodności nie przekraczał 1 min natomiast czas otrzymania pojedynczego skanu pola elektromagnetycznego o wymiarach  $2\text{cm}\times 2\text{cm}$  (płaszczyzna XY) wynosił 3 min (z krokiem co 2mm).

Przeprowadzona analiza (dla spektroskopii UV i zmian przewodności) bazowała na bardzo podobnym schemacie. W przypadku spektroskopii UV-Vis bazowała na wyznaczeniu  $A_{min}$  i  $A_{max}$  a następnie wykonaniu analiz czasowych, wyznaczeniu parametru "a" za pomocą funkcji fitującej oraz porównanie wyników badań próbek kontrolnych z próbkami poddanymi działaniu czynnika. W przypadku zmian przewodności, wyznaczenie parametru "a" za pomocą funkcji fitującej oraz porównanie wyników badań próbek kontrolnych z próbkami poddanymi działaniu czynnika dokonywano na podstawie pomiaru przewodności (średniej, pozyskanej z 20 pomiarów). W przypadku zmian dystrybucji pola elektromagnetycznego porównywano wartości  $A_{min}$  oraz  $A_{max}$  próbek napromienianych i próbek kontrolnych w kolejnych dniach eksperymentu.

Spektroskopia UV-Vis jest metodą eksperymentalną o małym stopniu trudności. Jest metodą dokładną. Dane z eksperymentu pozyskuje się szybko a ich jakość jest bardzo dobra. Pomiary są powtarzalne, błąd pomiaru nie przekracza 2%. Jest metodą dobrze opracowaną a metody analizy są powszechnie znane, stosowane i proste. Trudnością jest jedynie bezwzględne przestrzeganie reżimu pomiarowego, np. dokładności stężeń, czystości kuwet pomiarowych. Nawet najmniejszy odcisk palca pozostawiony na kuwecie będzie przyczyną artefaktów. Podobnie jak czystość rozpuszczalnika.

Dlatego też zaleca się prowadzenie eksperymentów w odpowiedniej odzieży (fartuch zabezpieczający oraz rękawiczki gumowe, które zabezpieczają badacza oraz ułatwiają utrzymanie czystości np. kuwet kwarcowych), zaleca się również stosowanie w przypadku rozpuszczalnika wody do iniekcji lub wody zdemineralizowanej.

Pomiar przewodności jest metodą prostą w aplikacji. Podobnie jak w przypadku spektroskopii UV-Vis jest to metoda umożliwiająca szybkie pozyskanie danych. Trudnością jest przestrzeganie stałej temperatury w pomieszczeniu. Musi ona być ciągle monitorowana ze względu na jej wpływ na pomiar. Dostyc czasochłonne jest precyzyjne ustawienie sondy pomiarowej (zawsze na tej samej głębokości, i precyzyjne odmierzenie badanej objętości roztworu). Sam pomiar jest łatwy i szybki.

Analiza danych dzięki możliwości zapisu widma w postaci numerycznej nie jest skomplikowana.

Metoda zmian dystrybucji pola elektromagnetycznego. Skaner pola elektromagnetycznego jest narzędziem bardzo precyzyjnym dzięki oprogramowaniu dla niego dedykowanemu. Zebranie pojedynczego skanu w porównaniu do wcześniej prezentowanych metod badawczych trwa trzy razy dłużej, natomiast uzyskane skany są kolorowe i spektakularne dzięki poszczególnym kolorom wskazującym na amplitudy pola elektromagnetycznego. Niestety do badania zmian konformacyjnych białek jest to metoda bardzo mało dokładna. Może być stosowana jako metoda wspomagająca natomiast raczej nie nadaje się jako główna metoda poznawcza. Badania powinny być wykonywane w specjalnych komorach ekranowych izolujących pomiar od wpływu otoczenia

Tabela 1. Porównanie metod badawczych

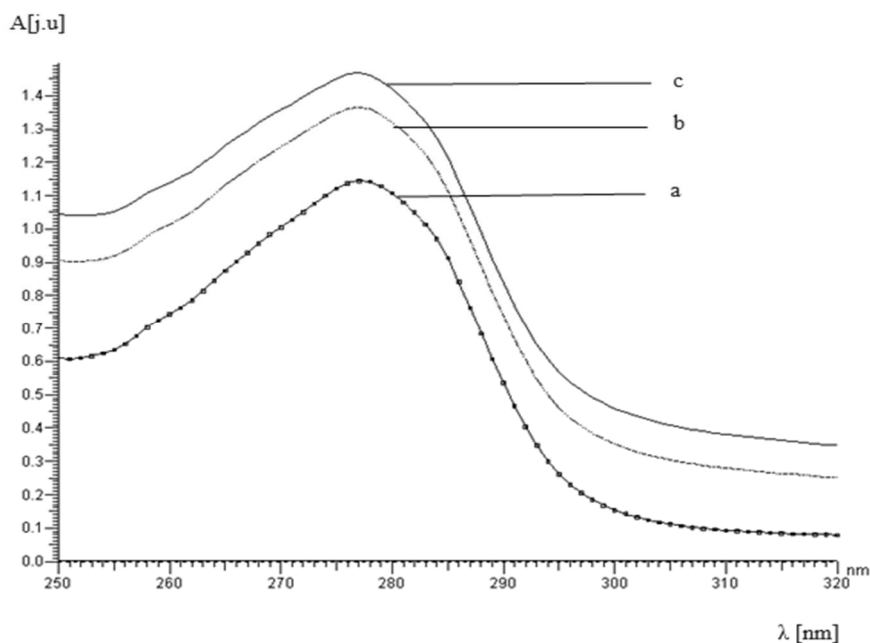
	Metoda UV -VIS	Zmiana przewodności	Zmiana dystrybucji pola elektromagnetycznego
<b>Sposób wykonania eksperymentu (pozyskanie danych)</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Zebranie widm absorpcyjnych za pomocą specjalistycznego oprogramowania dedykowanego dla spektrometru</li> <li>2. Automatyczne wyznaczenie wartości parametru <math>A_{min}</math> oraz <math>A_{max}</math></li> <li>3. Możliwość zapisu widma również w postaci numerycznej</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Zebranie widm przewodności za pomocą specjalistycznego oprogramowania dedykowanego dla konduktometru</li> <li>2. Możliwość zapisu widma również w postaci numerycznej</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Zebranie skanów pola elektromagnetycznego za pomocą specjalistycznego oprogramowania dedykowanego dla skanera</li> <li>2. Automatyczne wyznaczenie wartości parametru <math>A_{min}</math> oraz <math>A_{max}</math></li> <li>3. Możliwość zapisu widma również w postaci numerycznej</li> </ol>
<b>Czas wykonania pomiaru</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Dla badanego zakresu widma (250-320nm) czas zebrania pojedynczego widma nie przekraczał 1min.</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Dla badanego zakresu widma (czas zebrania pojedynczego widma nie przekraczał 1min.</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Czas zebrania pojedynczego skanu pola elektromagnetycznego o wymiarach 2cmx2cm (płaszczyzna XY) wynosił 3 min (z krokiem co 2mm)</li> </ol>
<b>Analiza</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Zestawienie parametrów <math>A_{min}/A_{max}</math></li> <li>2. Wykonanie analiz czasowych</li> <li>3. Wyznaczenie parametru "a" za pomocą funkcji fitującej</li> <li>4. Porównanie wyników badań próbek kontrolnych z próbkami</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Na podstawie widna wyznaczenie średniej przewodności dla pojedynczego skanu</li> <li>2. Wykonanie analiz czasowych</li> <li>3. Wyznaczenie parametru "a" za pomocą funkcji fitującej</li> <li>4. Porównanie wyników badań próbek kontrolnych</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Wyznaczenie <math>A_{min}</math> oraz <math>A_{max}</math>.</li> <li>2. Porównanie otrzymanych wielkości dla próbek promieniowanych i kontrolnych</li> </ol>

	<p>poddany długości 5. Wzrost tętno koformacji</p>	<p>próbki poddany długości 5. Wzrost tętno koformacji</p>	
--	--	---	--

### 3.2. Rezultaty badań i dyskusja

#### 3.2.1. Metoda spektrofotometrii UV-Vis

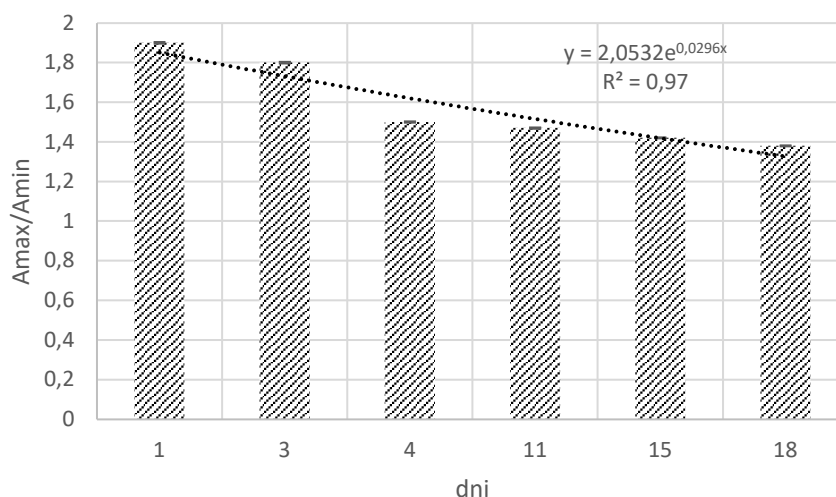
Rysunek 1 przedstawia widmo dla BSA-Au ze spektrofotometru UV-Vis w zakresie 250-320 nm. Na diagramie widoczne są trzy krzywe (a-c) odpowiadające próbkom bez promieniowania. Krzywa (a) odpowiada BSA-Au w pierwszym dniu trwania eksperymentu, (b) BSA-Au dla jedenastego dnia oraz (c) BSA-Au w osiemnastym dniu. Pik widoczny na spektrogramie pochodzi od występowania w próbce aminokwasów aromatycznych takich jak tyrozyna (Tyr) tryptofan (Thr) oraz phenyloalanina (Phe). Widać, że wraz z czasem na skutek denaturacji białka czyli jego rozfałdowywaniu, zmianie oddziaływań elektrostatycznych van der Waalsa oraz wzrostem udziału rozpuszczalnika, obserwuje się wzrost absorpcji. Można zatem powiedzieć, że wraz ze starzeniem się próbki absorpcja wzrasta.



Rysunek 1. Widmo promieniowania UV-Vis dla BSA-Au (kontroli) w pierwszym dniu (a), jedenastym dniu (b), osiemnastym dniu (c) trwania eksperymentu

Aby określić dynamikę zmian zachodzących w próbce wraz z upływem czasu dokonuje się zestawienia parametrów  $A_{max}/A_{min}$  w kolejnych dniach eksperymentu oraz dopasowuje się funkcję  $y=e^{ax}$ , gdzie wyznaczony parametr „a” świadczy o dynamice zmian. Parametry  $A_{min}$  oraz  $A_{max}$  jako parametry minimalnej

i maksymalnej wartości amplitudy zostały wyznaczone automatycznie przez oprogramowanie spektrometru UV-Vis. Przeprowadzone analizy bazowały na „dolinie widma”  $\lambda=251\text{nm}$  oraz maksymalnej wartości absorpcji dla  $\lambda=277\text{nm}$ . Rysunek 2 (Rys. 2) przedstawia wyznaczenie parametru „a” dla próbek kontrolnych.



Rysunek 2. Wyznaczanie dynamiki zmian na podstawie parametru „a” dla BSA-Au (kontroli) (a)

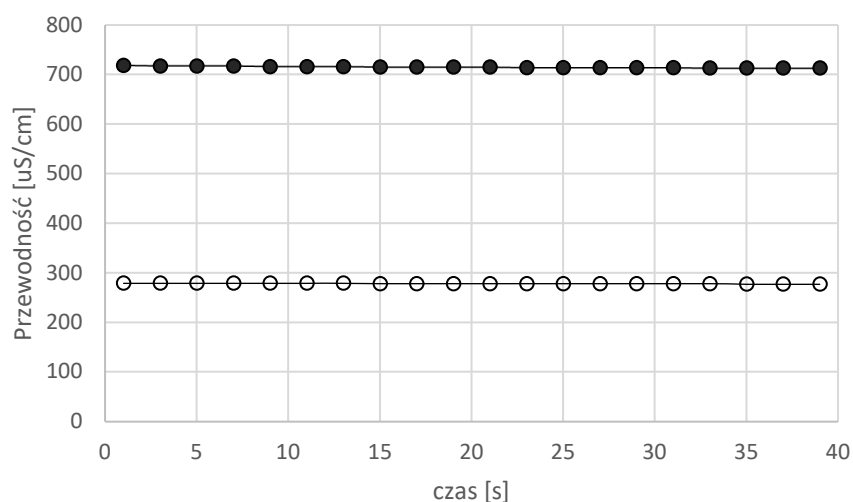
Porównując parametr „a” dla kompleksów BSA-Au (kontroli) oraz BSA-Au (napromieniowanej) widać, że wartość parametru „a” ( $a=0,0331\pm 0,0002$ ) dla próbek napromieniowanych jest większa niż dla próbek kontrolnych ( $a=0,0296\pm 0,0003$ ) można zatem wnioskować, że zmiany konformacyjne zachodzące w białku pod wpływem pola elektromagnetycznego z zakresu mikrofal zachodzą szybciej. Najprawdopodobniej związane są one z: przegrupowaniem w lokalnym środowisku uporządkowanego łańcucha polipeptydowego, zmianami w strukturze drugorzędowej białka, wzrostem ilości konformacji helisy i zmniejszenie struktury arkusza beta (co prowadzi do rozluźnienia szkieletu białka), tworzeniem agregatów białkowych prowadzących do denaturacji białka, procesami destrukcyjnymi w aminokwasach aromatycznych, zmianami odległości w łańcuchu polipeptydowym, osłabieniem stabilności kompleksu białkowego pod wpływem rozpuszczalnika, reorganizacją wody w makrocząsteczce kompleksów albuminy. Przeprowadzone badania wykazały, że zmiany pod wpływem promieniowania elektromagnetycznego zachodzą szybciej.

### 3.2.2. Metoda zmian przewodności

Rysunek 3 pokazuje przykładowe widmo pochodzące z pomiaru przewodności. Zmierzono przewodność kompleksów białkowych BSA-Au w czasie 39s. próbkowanie sygnału następowało co 2s. Wykres pokazuje przykładowe zmiany przewodności dla próbek BSA-Au (kontroli) w trzecim i piętnastym dniu trwania eksperymentu. Jak wykazały przeprowadzone badania w określonym dniu

przewodność roztworu była stała. Porównując wyniki badań przewodności w trzecim i piętnastym dniu widać, że wraz z czasem przewodność badanych roztworów rośnie. Za pomocą tej metody możemy wnioskować o przewodnictwie jonowym w badanych kompleksach. Jak podaje literatura [17] ruch jonów jest wypadkową działania trzech czynników: ruchów cieplnych o charakterze losowym, przepływu ośrodka jako całości oraz sił działających na te jony. Te ostatnie siły mogą pochodzić zarówno wewnątrz jak i z zewnątrz. Siły wewnętrzne to wynik występowania różnych gradientów: stężenia, temperatury, prędkości oraz oddziaływań elektrostatycznych między jonami. Siły zewnętrzne mogą być powodowane zmianami ciśnienia, polem grawitacyjnym czy polem elektrycznym

W prezentowanej pracy pokazano wpływ promieniowania na siły wewnętrzne i zewnętrzne. Wywołane zmiany przewodnictwa jonowego badanej substancji określano na podstawie zmierzonej przewodności.



Rysunek 3. Przykładowe numeryczne przedstawienie pomiaru przewodności w czasie dla BSA-Au w trzecim (znaczniki bez wypełnienia) i piętnastym dniu (znaczniki z wypełnieniem) trwania eksperymentu

Zmiany przewodnictwa wraz z czasem i pod wpływem pola świadczą o zmianie oddziaływań elektrostatycznych w kompleksach proteinowych. Na podstawie prezentowanych pomiarów przewodności obliczono parametr A (będący średnią w danym dniu z próbkowanego w czasie 39s sygnału). Następnie dokonano analizy zmian parametru A wraz z czasem (podobnie jak było to w przypadku analizy pomiarów UV-VIS, fitowanie funkcją  $y=e^{ax}$  umożliwiło otrzymanie wartości parametru „a” dla próbek promieniowanych parametr ten wynosił  $a=0,055\pm 0,0003$ , dla próbek kontrolnych  $a=0,0489\pm 0,0004$  widać zatem, że pod wpływem pola elektromagnetycznego zmiany oddziaływań elektrostatycznych zachodzą szybciej, co przekłada się na przyspieszoną denaturację badanych kompleksów pod wpływem pola. Otrzymany rezultat potwierdził wyniki otrzymane za pomocą spektroskopii UV-Vis. Stosunek współczynnika próbek promieniowanych do współczynnika



próbek promieniowanych wynosił  $1,12 \pm 0,004$  (dla zmian przewodności), a w przypadku spektroskopii UV-Vis było to  $1,11 \pm 0,005$ .

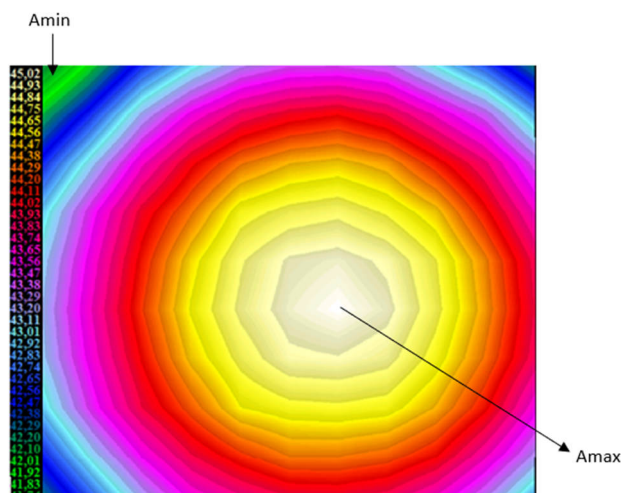
### 3.2.3. Metoda zmian dystrybucji pola elektromagnetycznego

Rysunek 4 prezentuje przykładowy skan dystrybucji pola elektromagnetycznego po przejściu przez badaną substancję.

Przedstawione kolory na widmie odpowiadają amplitudzie pola elektromagnetycznego.

Kolorem białym zaznaczono amplitudę 45,02 dB $\mu$ V, kolorem żółtym amplitudę w zakresie 44,93-44,56 dB $\mu$ V, kolejno dla koloru pomarańczowego (44,55-44,29 dB $\mu$ V), czerwonego (44,28-44,02 dB $\mu$ V), różowego (44,01-43,83 dB $\mu$ V) i w końcu dla niebieskiego (43,37-42,83 dB $\mu$ V).

Ponadto na spektrogramie zaznaczono również wartości maksymalne ( $A_{max}$ ) i minimalne ( $A_{min}$ ) amplitudy pola elektromagnetycznego. Ich wartość jest automatycznie określana za pomocą dedykowanego dla skanera oprogramowania.



Rysunek 4. Przykładowy skan dystrybucji pola elektromagnetycznego po przejściu przez badaną substancję

Przeprowadzoną analizę oparto na różnicy amplitud po przejściu przez badany roztwór ( $A_{sub}$ ) oraz przez warstwę wody ( $A_{ref}$ ) i powietrza, porównując skany dystrybucji dla próbek kontrolnych i promieniowanych w zaplanowanych w eksperymencie dniach. Zaobserwowano wzrost amplitudy sygnału po przejściu przez roztwór oraz wodę w stosunku do amplitudy impulsu po przejściu przez porównywalną warstwę powietrza. Efekt ten można wytłumaczyć jako efekt Maxwella Wagnera, efektem radioech oraz efektem Grossa. Sprowadza się on do wyjaśnienia przenikalności elektrycznej ( $\epsilon$ ) oraz przewodności ( $\sigma$ ) roztworu w oparciu o asymetryczne rozmieszczenie ładunku w pobliżu cząsteczek i na ich powierzchni. Ruch pojedynczego jonu w medium w pobliżu cząsteczki zależy od znaku jonu na powierzchni cząsteczki. Jeżeli jony są tego samego znaku, wtedy ładunek z medium swobodnie dyfunduje do cząsteczki. Jeżeli natomiast ładunki

jonów są przeciwne, wtedy jony medium muszą „podróżować” dookoła cząsteczki, tworzą się wtedy chmury ładunku elektrycznego, które kumulują się blisko siebie dając wzrost do indukowanych momentów dipolowych, stąd duża przenikalność dielektryczna zawiesin i zmiany amplitudy dystrybucji pola elektromagnetycznego. W badanych roztworach (podobnie jak w przypadku białek) powierzchnia cząsteczki jest wysoko-ładunkowa, dlatego też efekt przedkłada się na zmianę parametrów dielektrycznych, co w konsekwencji prowadzi do obserwowanych zmian w dystrybucji pola elektromagnetycznego [18]. Wartości amplitudy minimalnej i maksymalnej dla skanów pola próbek promieniowanych i próbek kontrolnych nieznacznie różniły się. Zaobserwowano także niewielkie zmiany dystrybucji pola badając zmiany czasowe. Widać zatem, że metoda ta może być stosowana jako metoda wspomagająca wnioskowanie na temat zmian konformacyjnych natomiast nie nadaje się jako narzędzie główne do analizy zmian konformacyjnych.

#### 4. Podsumowanie

W prezentowanej pracy przedstawiono porównanie metod badawczych: spektroskopii UV-Vis, zmian przewodności oraz zmian dystrybucji pola elektromagnetycznego. Dokonano porównania metod badawczych biorąc pod uwagę sposób wykonania eksperymentu, czas wykonania pomiaru oraz sposób wykonywania analiz.

Wskazano zalety i wady prezentowanych metod badawczych. Zastosowano zaprezentowane metody do badań zmian konformacyjnych kompleksów białkowych BSA-Au w czasie i pod wpływem promieniowania elektromagnetycznego.

Zastosowane metody pomimo tego iż bazowały na pomiarach różnych wielkości fizycznych potwierdziły przyspieszone procesy denaturacyjne w proteinie pod wpływem pola elektromagnetycznego. Spośród prezentowanych metod badawczych metodą najbardziej odpowiednią do badań zmian konformacyjnych okazała się metoda spektroskopii UV-Vis ze względu na jej dokładność i prostotę wykonywania pomiarów oraz dobrze opisane w literaturze analizy, które umożliwiają szybkie precyzyjne wyciągnięcie wniosków na podstawie przeprowadzonych badań.

#### LITERATURA

1. CHEN L.C., WANG E., TAI C.S., CHIU C., LI C.W., LIN Y.R., LEE T.H., TAI C.S., HUANG C.W., CHEN W.L.: Improving the reproducibility, accuracy, and stability of an electrochemical biosensor platform for point-of-care use. *Biosensors and Bioelectronics* 155 (2020), 1-7.
2. REYES-DE-CORCUERA J., OLSTAD H., GARCIA-TORRES R.: Stability and stabilization of enzyme biosensors: The key to successful application and commercialization. *Annu. Rev. Food Sci. Technol* 9 (2018), 293–322.
3. SONAWANE A., MANICKAM P., BHANSALI S.: Stability of Enzymatic Biosensors for wearable applications. *IEEE Review in Biomedical Engineering* 10 (2017), 1-14.
4. MANICKAM P., MARIAPPAN S.A., MURUGESAN S.M., HANSDA S., KAUSHIK A., SHINDE R., THIPPERUDRASWAMY P. Artificial Intelligence

- (AI) and Internet of Medical Things (IoMT) Assisted Biomedical Systems for Intelligent Healthcare. *Biosensors* **12**(8) (2022), 562.
5. BARONAS R., IVANAUSKAS F., KULYS J.: Mathematical modeling of biosensors an introduction for chemists and mathematicians. Springer Series on Chemical Sensors and Biosensors .*SENSORS* 9 (2010).
  6. GAO R., SONG Y., GAO Y., YANG X., BAO S.: Stable hemoglobin-based biosensor based on coordination-assisted microfluidic technology for hydrogen peroxide determination. *Sensors and Actuators Reports* **5** (2023), 100146.
  7. MARINEZ-IBERTON A., GASCH I., LISO-FERRANDO J., VALCUENDE M.: Development of a new Ni voltammetric sensor for hardened concrete conditions estimate. *Sensors and Actuators Reports* **5** (2023), 100155.
  8. HU R., LIU T., ZANG X.B., HUAN Y.S., WU C., FU T., TAN W.: Multicolor Fluorescent Biosensor for Multiplexed Detection of DNA. *Anal.Chem* **86**(2014),5009–5016.
  9. NGAMDEE K., NGEONTAE W.: Circular dichroism glucose biosensor based on chiral cadmium sulfide quantum dots. *Sensors and Actuators B: Chemical* **274**, (2018), 402-411.
  10. GAO Z., TANSIL N.: An ultrasensitive photoelectrochemical nucleic acid biosensor. *Nucleic Acids Research* **33** (2005), 2-8.
  11. HUANG P., XU L., XIE Y.: Biomedical Applications of Electromagnetic Detection: A Brief Review. *Biosensors* **11**(7) (2021), 225, 1-35.
  12. MICHNIK A., MICHALIK K., DRZAZGA Z.: Effects of UVC radiation on conformational restructuring of human serum albumin. *Journal of Photochemistry and Photobiology, B. Biology* **90** (3) (2008),170-178.
  13. KŁOS-Witkowska A.: Influence of fractional electromagnetic radiation doses on biosensor matrix component stability. *Acta Physica Polonica A* 133(1), (2018), 101-104.
  14. PICOLLO M., ACENTO T.: UV-Vis spectroscopy, *Physical Sciences Reviews* (2018) 20180008.
  15. MICHNIK A., MICHALIK K., DRZAZGA Z.: Stability of bovine serum albumin at different pH. *J Therm Anal Calorim* **80** (2005), 399–406.
  16. KŁOS-WITKOWSKA A., KAJSTURA K., Effect of UV Radiation Applied Fractionally or Continuously on Stability of Biosensor Receptor Layer Component. *Acta Physica Polonica A* **6** (138), (2020), 781-786.
  17. MOROŃ Z: *Pomiary przewodności elektrycznej cieczy przy małych częstotliwościach*, Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław (2003).
  18. POLK E., POSTOW: *Handbook of biological effects of electromagnetic fields*. Praca zbiorowa, Wyd 2. CRC Press, 1996.

