

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

В. П. Берест
Л. В. Січевська
Н. М. Жигалова

БІОФІЗИЧНИЙ ПРАКТИКУМ

Навчальний посібник

Харків – 2024

УДК 577.3(076)
Б 48

Рецензенти:

О. Ю. Гламазда – доктор фізико-математичних наук, старший дослідник, провідний науковий співробітник, Фізико-технічний інститут низьких температур імені Б. І. Веркіна НАН України;

К. Е. Нємченко – доктор фізико-математичних наук, професор, завідувач кафедри комп'ютерної фізики, Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна.

*Затверджено до друку рішенням Вченої ради
Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна
(протокол № 22 від 28 жовтня 2024 року)*

Берест В. П.

Б 48 Біофізичний практикум : навчальний посібник / В. П. Берест, Л. В. Січевська, Н. М. Жигалова. – Харків : ХНУ імені В. Н. Каразіна, 2024. – 156 с.

ISBN 978-966-285-853-2

Навчальний посібник містить детальний опис лабораторних робіт, задачі, тестові завдання та контрольні запитання до основних розділів навчальної дисципліни «Біофізика», яка викладається на кафедрі молекулярної і медичної біофізики Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна.

Для студентів вищих навчальних закладів спеціальності Е6 «Прикладна фізика та наноматеріали», аспірантів, наукових та інженерно-технічних фахівців у галузі біофізики та споріднених напрямків.

УДК 577.3(075.8)

ISBN 978-966-285-853-2

© Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, 2024

© Берест В. П., Січевська Л. В.,
Жигалова Н. М., 2024

© Дончик І. М., макет обкладинки, 2024

ЗМІСТ

Передмова	4
<i>Лабораторна робота № 1.</i> Дослідження спектральних властивостей макромолекул	7
<i>Лабораторна робота № 2.</i> Визначення дзета-потенціалу дріжджових клітин. Мікрофлюїдика	18
<i>Лабораторна робота № 3.</i> Взаємодія флуоресцентних барвників з компонентами клітини.....	30
<i>Лабораторна робота № 4.</i> Дослідження зв'язування лігандів з клітинною поверхнею	40
<i>Лабораторна робота № 5.</i> Нанобіофізика. Створення ліпосом та визначення їх розміру	52
<i>Лабораторна робота № 6.</i> Визначення проникності еритроцитів для іонів калію методом іоноселективних електродів	64
<i>Лабораторна робота № 7.</i> Визначення концентрації і розмірів клітин методом світлопольної мікроскопії	71
<i>Лабораторна робота № 8.</i> Визначення розмірів еритроцитів методом дифракції лазерного променя.....	81
<i>Лабораторна робота № 9.</i> Дослідження концентраційної та температурної залежностей мембранного потенціалу	89
<i>Лабораторна робота № 10.</i> Реєстрація потенціалу дії кардіоміоцитів	97
<i>Лабораторна робота № 11.</i> Виділення субклітинних фракцій методом диференційного центрифугування.....	110
<i>Лабораторна робота № 12.</i> Дослідження взаємодії високочастотного електромагнітного поля з речовиною	121
<i>Лабораторна робота № 13.</i> Вплив фізичних факторів на розподіл еритроцитів за стійкістю	133
<i>Лабораторна робота № 14.</i> Дослідження впливу ультрафіолетового опромінення на поверхневий натяг ліпідних плівок	141

ПЕРЕДМОВА



Біофізичне дослідження полягає у постановці фізико-математичної проблеми, яка належить до біологічних систем, та розв'язання її методами експериментальної, теоретичної фізики та математичного моделювання.

Лабораторний біофізичний практикум органічно доповнює навчальний курс «Біофізика» та дозволяє студентам на практиці закріпити набуті теоретичні знання, сформувані практичні навички та компетенції експериментальної роботи.

Тематика лабораторного практикуму включає опис фізичних явищ та експериментальних засобів, які покладено в основу сучасних методів та техніки біофізичних досліджень.

Основні завдання лабораторного практикуму з біофізики полягають у вивченні властивостей біологічних об'єктів, їх реакції на дію фізичних чинників, характеру міжмолекулярних взаємодій, набутті практичних навичок проведення біофізичних досліджень, оволодінні біофізичними методами і конкретними експериментальними методиками, знайомстві з вимірювальною апаратурою, отриманні, обробці та інтерпретації експериментальних даних, оформленні звітів та презентації своєї роботи.

Виконання лабораторної роботи складається з декількох етапів: підготовки, отримання допуску до виконання роботи, власне проведення лабораторного експерименту, оформлення отриманих результатів і звіту про виконану роботу.

1. При підготовці необхідно:

- самостійно засвоїти основні теоретичні відомості, поняття і визначення, одиниці вимірюваних фізичних величин і порядок їх значень; усвідомити постановку задачі і сутність методу; зрозуміти мету роботи; вивчити зміст завдань і методику експерименту;

- оформити короткий конспект майбутньої роботи, в якому відображаються питання, які поставлені вище;

- безпосередньо перед отриманням допуску до виконання роботи необхідно отримати опис на лабораторну установку та інструкцію по роботі на ній; уважно вивчити опис та інструкцію, при цьому звернути увагу на склад і призначення окремих частин, основний принцип роботи і призначення регулювань приладу.

2. Під час співбесіди на отримання допуску до роботи студент повинен представити лабораторний журнал з конспектом майбутньої роботи, а також проявити чітке розуміння змісту майбутньої роботи.

3. Перед початком виконання роботи слід перевірити комплектність лабораторного обладнання, правильність з'єднань, після чого отримати дозвіл викладача або інженера підключити установку до електричної мережі. В процесі виконання роботи всі дані вимірювань, результати спостережень і свідчення приладів заносяться в лабораторний журнал. Після виконання експерименту переконатися в тому, що всі завдання виконані повністю, і представити попередні результати викладачеві. У разі позитивного відгуку робота вважається виконаною, і необхідно здати робоче місце інженеру.

4. Оформлення звіту проводиться в зручний для студента час, і на найближчих заняттях звіт здається викладачеві. Вимоги до оформлення звіту про виконану лабораторну роботу перераховані нижче.

Зміст звіту має складатися з 4-х основних частин: теоретичної частини; методики експерименту, результатів та їх обговорення, висновків.

Теоретична частина містить постановку задачі; основні формули і визначення, сутність методу і мету роботи.

Методика експерименту містить короткий опис і схему лабораторної установки і, власне, методику – послідовність проведення роботи.

Визначення похибок результатів експериментів проводять за методикою, яка представлена в посібнику: Савченко О. М. Фізика. Практикум : методичні вказівки для студентів природничих факультетів. – Харків : ХНУ імені В. Н. Каразіна, 2013. – 77 с. Видання доступно з сайту відкритого електронного архіву: <https://ekhnui.karazin.ua/server/api/core/bitstreams/fad31f36-827b-4d8d-bcc1-eb389c6fe1fb/content>. Статистична обробка результатів проводиться відповідно до розділів навчальної дисципліни «Теорія імовірності і математична статистика».

Результати і обговорення складаються з:

- робочої частини у вигляді таблиць показань приладів, коментарів до них, записів вимірювань і спостережень;

- результатів у вигляді таблиць експериментальних даних та даних, оброблених за формулами, і графіків залежностей.

Графіки будуються в довільних програмних засобах. При побудові графіка значення незалежної змінної слід відкладати по осі абсцис X , а значення функції – на осі ординат Y . Координатні осі повинні мати назву (позначення) і одиниці величин, що відкладаються. Для наочного уявлення графіка важливим моментом є оптимальний вибір масштабу. Допускається використання тільки лінійного або логарифмічного масштабу по осях, тобто виконання графіків можливо в лінійному, логарифмічному і напівлогарифмічному масштабі. Напівлогарифмічний масштаб – це прямокутна система координат, по одній осі якої (осі абсцис) відкладається лінійний масштаб, по другій – логарифмічний. При використанні логариф-

мічного масштабу по осях відкладаються логарифми величин. Логарифмічний масштаб зручний при побудові графіків типу ступеневої функції; напівлогарифмічний – для подання графіка типу показової функції.

Хоча в загальному масштаб може бути обраний довільно, проте слід дотримуватися наступних рекомендацій:

1) графік повинен оптимальним чином укладатися в області, яка обмежується координатною сіткою;

2) розміри графіка по обох осях повинні бути приблизно однаковими, наскільки дозволяє розумне подання інтервалів між експериментальними точками;

3) перетин координатних осей не обов'язково має збігатися з нульовими значеннями X і Y .

При побудові графіка відзначають експериментальні точки та інтервали похибки для кожної точки. Різні криві, зображені на одному рисунку, повинні мати різні позначення і виноску, зміст якої розшифровується в підписі до рисунка.

В обговоренні необхідно провести аналіз отриманих результатів та зіставлення їх з теоретичними уявленнями. Якщо необхідно, пояснити причину відхилення.

Висновки містять коротке формулювання фактів, встановлених у процесі виконання роботи.

5. Для здачі лабораторної роботи необхідно обов'язково мати при собі журнал з оформленим звітом про виконання лабораторної роботи. У процесі здачі слід розповісти про виконану роботу, представити результати, проявити знання теоретичних основ при поясненні отриманих результатів, сформулювати висновки, розв'язати задачі, виконати тестові завдання та відповісти на контрольні запитання.

Лабораторна робота № 1



ДОСЛІДЖЕННЯ СПЕКТРАЛЬНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ МАКРОМОЛЕКУЛ

Мета роботи: ознайомитися з теоретичними основами методу абсорбційної спектрофотометрії, дослідити зразки біополімерів методом спектрофотометрії.

Підготовка до роботи

Повторити наступні питання:

1. Основний закон абсорбційної спектрофотометрії – закон Бугера–Ламберта–Бера.
2. Особливості хімічної структури біополімерів (білки, ДНК).
3. Фізико-хімічні властивості амінокислот і нуклеїнових основ.
4. Особливості поглинання енергії світла біомолекулами.

Властивість атомів і молекул поглинати світло з певною довжиною хвилі, характерною для даної речовини, використовується для якісних і кількісних досліджень. Поглинання світла пов'язане з електронними переходами між енергетичними рівнями в молекулах, тому аналіз спектрів поглинання дозволяє схарактеризувати будову молекул, хімічний склад речовини та її стан у біологічних структурах.

Поглинання кванта електромагнітної енергії атомами і молекулами здійснюється в широкому діапазоні довжин хвиль. Класифікація діапазонів електромагнітного випромінювання представлена в таблиці 1.

Таблиця 1

Класифікація діапазонів електромагнітного спектра

Область спектра	Спектральні характеристики	
	λ , нм	ν , см^{-1}
Вакуумний ультрафіолет	10–200	$5 \cdot 10^4$ – 10^6
Ультрафіолет	200–400	$2,5 \cdot 10^4$ – $5 \cdot 10^4$
Видима	400–750	$1,3 \cdot 10^4$ – $2,5 \cdot 10^4$
Ближня інфрачервона	750 – $2,5 \cdot 10^4$	400 – $1,3 \cdot 10^4$
Дальня інфрачервона	$2,5 \cdot 10^4$ – 10^6	10–400

Абсорбційна спектроскопія – розділ спектроскопії, який досліджує поглинальну здатність хімічних речовин. Абсорбційні спектри отримують при пропусканні електромагнітного випромінювання через шар досліджуваної речовини. Кожна речовина має свій індивідуальний спектр поглинання.

Принцип ультрафіолетової спектроскопії базується на властивості молекул речовини поглинати випромінювання в діапазоні довжин хвиль 190–380 нм (УФ–діапазон). При поглинанні молекулою електромагнітних коливань здійснюється перехід із незбудженого стану в збуджений з більш високим рівнем енергії – перехід з одного енергетичного рівня на інший. Частота випромінювання, яке поглинається та викликає перехід молекул з одного стану в інший, пов’язана з енергіями цих станів співвідношенням

$$\nu = \frac{(E_2 - E_1)}{h}, \quad (1)$$

де ν – частота електромагнітної хвилі;
 E_1 – енергія основного незбудженого стану;
 E_2 – енергія збудженого стану;
 h – стала Планка ($6,626 \cdot 10^{-34}$ Дж с).

Однозначний кількісний зв’язок між енергією квантів, що поглинаються, і хвильовими характеристиками випромінювання визначається формулою Планка:

$$E = h\nu = \frac{h \cdot c}{\lambda}, \quad (2)$$

де λ – довжина хвилі; c – швидкість світла.

Якщо серед багатьох станів частинки не можна знайти пару таких станів, щоб різниця їх енергій дорівнювала $h\nu$ енергії падаючого кванта, то випромінювання з частотою ν , згідно з формулою (2), не повинно поглинатися речовиною, яка складається з цих частинок.

Поглинання молекулою електромагнітного випромінювання супроводжується зміною енергії електронів (електронні переходи), зміною коливання ядер атомів (коливальні переходи), а також зміною обертання диполя (обертальні переходи). Для збудження електронних переходів необхідно більше енергії, ніж для здійснення коливальних і обертальних переходів. Тому поглинання в ультрафіолетовій і видимій областях спектра викликає електронні переходи в молекулі, поглинання інфрачервоного і більш довгохвильового випромінювання – коливальні і обертальні переходи. Поглинання кванта світла молекулами речовини в ближній ультрафіолетовій і видимій областях спектра можливе за наявності в їх структурі спряжених подвійних зв’язків і гетероатомів, що входять у систему цих зв’язків (наприклад: атом азоту в індольному кільці триптофану). Енергія верхніх заповнених електронних рівнів у неподілених електронів гетероатомів (n–орбіталі) значно перевищує енергію як σ –електронів, які утворюють одинарні зв’язки між атомами (σ –орбіталі), так і π –електронів, які утворюють спряжені подвійні зв’язки (π –орбіталі). Розподіл енергій зазначених

електронних станів з можливими енергетичними переходами при поглинанні молекулою випромінювання в ультрафіолетовому діапазоні схематично представлено на рис. 1.

При поглинанні фотонів можуть відбуватися електронні переходи таких типів:

$\sigma \rightarrow \sigma^*$ – високоенергетичний короткохвильовий перехід з максимумом поглинання 190 нм і менше; $\pi \rightarrow \pi^*$ – для збудження такого переходу необхідним є фотон з енергією набагато меншою, ніж у першому випадку, максимум поглинання 260 нм і менше; $n \rightarrow \pi^*$ – довгохвильовий перехід з максимумом поглинання 340 нм і менше.

Різниця енергій між енергетичними рівнями визначає довжину хвилі, на якій відбувається поглинання випромінювання, ймовірність переходу між цими рівнями – коефіцієнт поглинання речовини. Інтенсивність смуг поглинання визначається ймовірністю переходу молекул з основного стану в збуджений. Залежність ймовірності поглинання випромінювання речовиною від частоти або довжини хвилі випромінювання називається **спектром поглинання**. Набір частот або довжин хвиль, що поглинаються, визначається природою речовини. Спектри поглинання біополімерів є порівняно плавними кривими з одним або кількома максимумами, у той час як спектри поглинання атомів і простих молекул в газовій фазі мають лінійчатий вигляд.

На практиці вимірювання спектрів поглинання зводиться до оцінки частки випромінювання, яка була поглинена певним об'ємом речовини на різних довжинах хвиль. Розглянемо шар завтовшки l , в якому в концентрації C знаходиться речовина, що поглинає випромінювання. При проходженні випромінювання з інтенсивністю потоку I_0 через шар завтовшки Δl інтенсивність випромінювання зменшиться на величину ΔI . Величина ΔI залежить від інтенсивності падаючого випромінювання I_0 , товщини шару Δl і концентрації поглинаючої речовини в шарі. Кількість поглинаючої речовини пропорційна його концентрації C і товщині шару Δl . Якщо ввести коефіцієнт пропорційності k – ефективну площу поперечного перерізу молекули, яка поглинає кванти світла, характерний для даної речовини і даної довжини хвилі, то можна записати:

$$\Delta I = -k \cdot C \cdot \Delta l \cdot I_0. \quad (3)$$

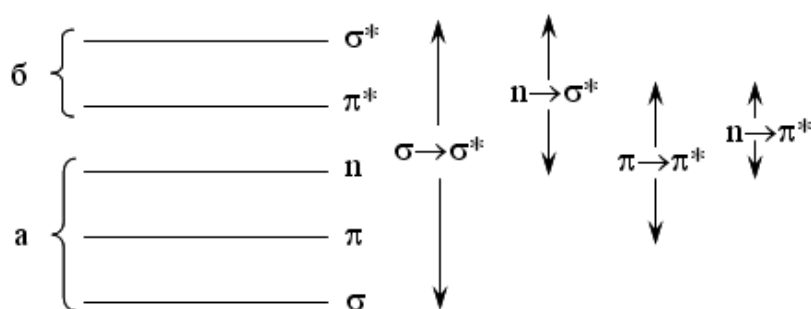


Рис. 1. Схема електронних переходів між різними типами атомних і молекулярних орбіталей:
а – орбіталі основного стану; б – вакантні орбіталі

За умови, коли $\Delta l \rightarrow 0$, вираз (3) можна записати в диференціальній формі:

$$\frac{dI}{I_0} = k \cdot C \cdot dl. \quad (4)$$

Інтегруючи вираз (4) у межах від I_0 до I для dI та від 0 до l для dl , отримаємо вираз:

$$I(x) = I_0 \exp(-kCl). \quad (5)$$

Вираз (5) є **законом Бугера–Ламберта–Бера** – основним законом абсорбційної спектрофотометрії, що пов’язує інтенсивність I випромінювання, яке пройшло через шар, і інтенсивність I_0 випромінювання, що падає на нього.

Якщо коефіцієнт пропорційності $k=2,303 \varepsilon$, то закон Бугера–Ламберта–Бера матиме вигляд:

$$I(x) = I_0 \exp(-2,303\varepsilon Cl) = I_0 10^{-\varepsilon Cl}. \quad (6)$$

Величина ε , що характеризує здатність речовини до поглинання світла певної довжини хвилі, називається **молярним коефіцієнтом екстинкції**. Якщо товщина шару вимірюється в $см$, а концентрація – в $моль/л$, то одиницею виміру ε є $л/(моль \cdot см)^{-1}$. Оскільки кількість молей в літрі дорівнює кількості мілімолей в $мл$, тобто в $1 см^3$, можна ту ж одиницю записати у вигляді $см^3/ммоль$. За фізичним змістом молярний коефіцієнт екстинкції в цій системі одиниць є числом, що показує, на якій площі потрібно розмістити $1 ммоль$ ($6,022 \times 10^{20}$ молекул) речовини, щоб при проходженні випромінювання через таку поверхню інтенсивність випромінювання зменшилася би у 10 разів.

Співвідношення (5) часто записують у прологарифмованому вигляді, увівши поняття **оптичної щільності** шару речовини як десяткового логарифма відношення інтенсивності потоку, падаючого на речовину випромінювання до інтенсивності потоку випромінювання, яке пройшло крізь речовину:

$$D = \lg\left(\frac{I_0}{I}\right). \quad (7)$$

При цьому:

$$D = \varepsilon Cl. \quad (8)$$

Спектрофотометрично концентрацію C речовини можна визначити вимірюючи значення оптичної щільності зразка. З формул (7) і (8) видно,

що $C = \frac{D}{\varepsilon \cdot l}$, де ε – молярний коефіцієнт екстинкції, l – товщина шару, який поглинає світло.

Здатність біологічних молекул поглинати світло зумовлена наявністю в їх складі хромофорів – молекулярних груп, що поглинають світло. Зазвичай це полярні групи або групи з ненасиченими зв'язками. Приклади таких груп і орієнтовні значення їх $\lambda_{\max}$ наведено в таблиці 2. Якщо два хромофори розділені досить довгим вуглеводневим ланцюгом, їх поглинання буде практично адитивним, тоді як при близькому розташуванні вони можуть через спряження впливати один на одного, істотно змінюючи спектр молекули.

Таблиця 2

Приклади хромофорних груп

Хромофор	$-\text{C}\equiv\text{C}-$	$-\text{C}_6\text{H}_5$	$-\text{NO}_2$	$>\text{C}=\text{O}$	$-\text{N}=\text{N}-$
$\lambda_{\max}$, нм	180	270	270	280	370

Білки мають три типи хромофорних груп: власне пептидні групи, бічні групи амінокислотних залишків і простетичні групи.

Перші дві поглинають в УФ-області і не поглинають у видимій області.

У ближньому ультрафіолетовому діапазоні спектра поглинають тільки три амінокислоти: триптофан, тирозин, фенілаланін. Максимуми поглинання є специфічними для кожної амінокислоти та спостерігаються в області 260–280 нм (таблиця 3).

Таблиця 3

Спектральні властивості амінокислот при нейтральному рН

Амінокислоти	ε , $\text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1} \cdot \text{л}$	$\lambda_{\max}$, нм
Триптофан	$5,6 \cdot 10^3$	280
Тирозин	$1,38 \cdot 10^3$	275
Фенілаланін	$0,18 \cdot 10^3$	257

Спектри амінокислот у структурі білка практично не змінюються. Тому оптична щільність розчину білка дорівнює сумі оптичних щільностей триптофану, тирозину і фенілаланіну. Амінокислоти у вільному стані містять вільні карбоксильні й аміногрупи, тому їх спектри поглинання можуть змінюватися зі зміною рН. Найбільш чутливий до змін рН розчину спектр поглинання тирозину. У лужному середовищі тирозин переходить в іонізовану форму – тирозинат. Спектр поглинання тирозинату зміщується в довгохвильову область з максимумом поглинання 294 нм. Спектри поглинання триптофану змінюються при застосування високих концентрацій H_2SO_4 , що призводить до іонізації NH -групи триптофану. У результаті спектр поглинання триптофану змінює форму й зміщується в довгохвильову область.

Методом спектрофотометричного аналізу оцінюють чистоту білкових препаратів і відсутність у їх складі нуклеїнових кислот. З цією метою

визначають значення оптичної щільності на довжинах хвиль 260 нм і 280 нм. Співвідношення D_{280}/D_{260} є показником чистоти білкового препарату, якщо $D_{280}/D_{260} > 1,6-1,7$ – це показник високої чистоти зразка.

Нуклеїнові кислоти поглинають тільки в УФ області (180–220 нм і 240–280 нм). Їх хромофорами є, здебільшого, пуринові й піримідинові основи. Основні смуги поглинання всіх нуклеотидів, крім цитидину, розташовані близько 260 нм, у цитидину – 270 нм. Коефіцієнти молярної екстинкції хромофорних груп біополімерів залежать від природи розчинника, рН, довжини хвилі. У таблиці 4 наведено коефіцієнти молярної екстинкції для чотирьох основ при 260 нм.

Таблиця 4

Коефіцієнти поглинання пуринових і піримідинових основ

Основа	ε , моль ⁻¹ ·см ⁻¹ ·л
Аденін	$13,4 \cdot 10^3$
Гуанін	$7,2 \cdot 10^3$
Цитидин	$5,55 \cdot 10^3$
Тимін	$7,4 \cdot 10^3$

Спектр поглинання ДНК є сумою спектрів поглинання мономерних нуклеотидів; його основна смуга поглинання розташована при 260 нм. Однак поглинання нативної ДНК помітно менше, ніж поглинання всіх основ, що входять до її складу. При переході від нативної ДНК (полінуклеотиду) до мононуклеотидів відбувається приріст поглинання – **гіперхромний ефект**. Гіперхромізм проявляється вже в дінуклеотиді (від 2 % до 11 %). Ефект зростає зі збільшенням довжини ланцюга й досягає максимального значення в олігонуклеотидів з 5–6 залишків.

Величину гіперхромного ефекту оцінюють, вимірюючи оптичну щільність при 260 нм для нативної ДНК (або полінуклеотиду) – D_2 і денатурованої ДНК (або мононуклеотиду) – D_1 , за формулою:

$$\text{Гіперхромний ефект} = \frac{D_1 - D_2}{D_2} \cdot 100\% \quad (9)$$

Гіперхромізм проявляється при переході від двоспіральної структури до односпіральної (проте в меншій мірі, ніж при переході від полінуклеотидів до мононуклеотидів). Він зумовлений тим, що в подвійній спіралі ДНК площини основ паралельні, така конфігурація призводить до сильної взаємодії основ і зниження поглинання. Гіперхромний ефект широко використовується як критерій визначення ступеня денатурації ДНК.

Виконання роботи

Лабораторне обладнання та матеріали: спектрофотометр СФ-46, кварцові кювети, пробірки, водні розчини ароматичних амінокислот, білка і ДНК, дистильована вода, дозаторні піпетки, водяна баня, лід, фільтрувальний папір.

Завдання 1. Вимірювання спектра поглинання розчину ДНК.

1. Підготувати до роботи спектрофотометр СФ-46.
2. Виміряти поглинання водного розчину ДНК в діапазоні довжин хвиль 220–320 нм через кожні 5 нм, а в ділянці спектра 250–270 нм – через 3 нм. Отримані експериментальні дані занести в таблицю.

λ , нм	D , відн. од.	λ , нм	D , відн. од.	λ , нм	D , відн. од.	λ , нм	D , відн. од.
220		...		...		...	
225		...		...		...	
...		...		...		315	
...		...		...		320	

3. Побудувати спектр поглинання $D(\lambda)$ для нативної ДНК.
4. Визначити концентрацію ДНК в розчині, використовуючи закон Бугера–Ламберта–Бера.

Завдання 2. Визначення гіперхромного ефекту ДНК.

1. Розчин ДНК, використовуваний в завданні 1, залити в пробірку з притертою пробкою. Опустити пробірку в гарячу водяну баню ($T=95^\circ\text{C}$) на 10–15 хвилин. Потім пробірку з розчином ДНК остудити на льоду.
2. Виміряти поглинання денатурованої ДНК в такому самому діапазоні довжин хвиль, як і в завданні 1. Заповнити таблицю отриманими експериментальними даними.
3. Побудувати спектр поглинання $D(\lambda)$ для денатурованої ДНК.
4. Проаналізувати спектри, отримані в *Завданнях 1 та 2*. Оцінити величину гіперхромного ефекту за формулою (7).

Завдання 3. Вимірювання спектрів поглинання ароматичних амінокислот у вільному стані.

1. Приготувати водні розчини триптофану в концентраціях 0,1 мг/мл, 0,05 мг/мл, 0,025 мг/мл, при $\text{pH} = 7$. Зареєструвати поглинання отриманих розчинів в області 210–320 нм через кожні 5 нм. Заповнити таблицю отриманими експериментальними даними.

λ , нм	0,1 мг/мл	0,05 мг/мл	0,025 мг/мл	λ , нм	0,1 мг/мл	0,05 мг/мл	0,025 мг/мл
210				315			
215				320			
...							

2. Побудувати та проаналізувати спектри поглинання $D(\lambda)$, перевірити справедливість закону Бугера–Ламберта–Бера.

3. Приготувати два розчини триптофану (0,05 мг/мл) в 5 М і 13 М розчині сірчаної кислоти. Зареєструвати поглинання в області 210–320 нм через кожні 5 нм. Заповнити таблицю отриманими експериментальними даними.

λ , нм	5 М	13 М	λ , нм	5 М	13 М
210			...		
215			315		
...			320		

4. Побудувати спектри поглинання $D(\lambda)$ та порівняти ці спектри зі спектром розчину триптофану при рН = 7 для концентрації 0,05 мг/мл.

5. Пояснити спостережуваний ефект. Розрахувати коефіцієнти молярної екстинкції в максимумах для водного та кислотного розчинів триптофану.

Завдання 4. Вимірювання спектрів поглинання розчинів білків.

1. Приготувати водні розчини білків яєчного альбуміну й трипсину в концентраціях 0,2 мг/мл і 0,6 мг/мл.

2. Зареєструвати поглинання білків в області 210–320 нм через кожні 5 нм. Заповнити таблицю отриманими експериментальними даними.

λ , нм	альбумін		трипсин	
	0,2 мг/мл	0,6 мг/мл	0,2 мг/мл	0,6 мг/мл
210				
215				
...				
315				
320				

3. Побудувати спектри поглинання $D(\lambda)$ та оцінити ступінь чистоти білкових препаратів, значення коефіцієнтів екстинкції в максимумах для обох зразків.

Завдання 5. Зробити висновки.

Завдання 6. Розв'язати задачі.

1. Оптична щільність розчину, що містить речовину з молярною масою $M=423$ в концентрації $C=23$ мкг/мл, становить 0,27 при довжині хвилі $\lambda=540$ нм в кюветі $l=1$ см. Знайти молярну концентрацію і коефіцієнт молярного поглинання для даної речовини.

2. Є розчин аденіну, оптична щільність якого при $\lambda=260$ нм становить 0,5, і розчин гуаніну, оптична щільність якого для тієї ж довжини хвилі –

0,36. Яка оптична щільність розчину тієї ж товщини, якщо змішали по 1 мл кожного розчину? Вважати, що молекули не взаємодіють між собою.

3. Визначити концентрацію C речовини, якщо її шар завтовшки $l=1$ см зменшує в 8 разів інтенсивність падаючого потоку світла заданої довжини хвилі. Молярний коефіцієнт екстинкції речовини $\varepsilon=10,75 \text{ л} \cdot (\text{моль} \cdot \text{см})^{-1}$.

4. Водний розчин аденозину (0,1 мл) розбавили до об'єму 25 мл. Після розведення оптична щільність розчину склала 0,77 при $\lambda=260$ нм в кюветі завтовшки 1 см. Яке пропускання розведеного розчину і чому дорівнює концентрація аденозину до розведення, якщо $\varepsilon=1,54 \cdot 10^4 \text{ л} \cdot (\text{моль} \cdot \text{см})^{-1}$?

5. Розчин ДНК з $M=500000$ Да і концентрацією 50 мг/мл має оптичну щільність $D=0,66$, товщина кювети 1 см. Визначте коефіцієнт молярного поглинання для даної ДНК. Поясніть, чому отриманий коефіцієнт молярного поглинання для нативної ДНК менше, ніж для нуклеотидних основ?

6. У кюветі завтовшки 1 см досліджували поглинання розчину речовини з концентрацією 64 мкг/мл. Визначити оптичну щільність і пропускання розчину при $\lambda=546$ нм, якщо $\varepsilon=3 \cdot 10^5 \text{ л} \cdot (\text{моль} \cdot \text{см})^{-1}$, $M=320$ кДа.

Завдання 7. Виконати тестові завдання.

1. Спектр поглинання електромагнітних хвиль речовиною – це:

а) залежність енергії електронних переходів в речовині від частоти або довжини хвилі випромінювання;

б) залежність ймовірності поглинання випромінювання речовиною від частоти або довжини хвилі випромінювання;

в) залежність частоти або довжини хвилі випромінювання від ймовірності поглинання випромінювання речовиною.

2. До хромофорів білкових молекул відносять:

а) аденін, гуанін, цитидин, тимін;

б) аденін, гуанін, триптофан, тирозин;

в) триптофан, тирозин, фенілаланін;

г) тирозин, фенілаланін, цитидин, тимін.

3. Закон Бугера–Ламберта–Бера:

а) $I(x) = -I_0 \exp(kxC)$;

б) $I(x) = -I_0 \exp(xC)$;

в) $I(x) = I_0 \exp(-kxC)$;

г) $I(x) = I_0 \exp(kxC)$.

4. Дайте визначення коефіцієнта молярної екстинкції:

а) величина, що характеризує здатність речовини до випромінювання світла певної довжини хвилі;

б) величина, що характеризує здатність речовини до поглинання світла певної довжини хвилі;

с) величина, що характеризує здатність молекул до заломлення світла певної довжини хвилі;

д) величина, що характеризує здатність речовини утворювати зв'язки під дією випромінювання певної довжини хвилі.

5. До хромофорів молекули ДНК відносять:

а) аденін, гуанін, триптофан, тирозин;

б) аденін, гуанін, цитидин, тимін;

с) триптофан, тирозин, фенілаланін;

д) тирозин, фенілаланін, цитидин, тимін.

6. Максимум смуги поглинання для молекули ДНК:

а) 260 нм;

б) 265 нм;

с) 280 нм;

д) 320 нм.

7. Поняття гіперхромного ефекту:

а) приріст поглинання макромолекули ДНК при переході від мононуклеотиду до полінуклеотиду;

б) приріст поглинання макромолекули ДНК при переході від полінуклеотиду до мононуклеотидів;

с) спад поглинання макромолекули ДНК при переході від полінуклеотиду до мононуклеотидів;

д) спад поглинання макромолекули ДНК при переході від мононуклеотиду до полінуклеотиду.

8. Чим пояснюється гіперхромний ефект в молекулі ДНК:

а) більшою здатністю до поглинання полімерних форм нуклеотидів;

б) більшою здатністю до поглинання концентрованих розчинів полімерних форм нуклеотидів;

с) більшою здатністю до поглинання мономерних форм нуклеотидів;

д) більшою здатністю до поглинання розбавлених розчинів мономерних форм нуклеотидів?

9. Максимум смуги поглинання для білкових молекул:

а) 260 нм;

б) 265 нм;

с) 280 нм;

д) 320 нм.

10. Величина гіперхромного ефекту залежить від:

а) співвідношення хромофорних груп у складі молекули ДНК;

б) довжини ланцюга молекули ДНК;

с) послідовності нуклеотидів у ланцюгу ДНК;

д) молекулярної маси молекули ДНК.

Контрольні питання

1. Дайте визначення спектра поглинання електромагнітних хвиль речовиною.
2. Чим пояснюється наявність смуг поглинання електромагнітних хвиль макромолекулами в УФ-області спектра?
3. Які фізико-хімічні особливості біополімерів визначають положення максимумів їх спектрів поглинання (довгохвильова й короткохвильова області)?
4. Чому атоми й прості молекули в газовій фазі мають лінійчасті спектри поглинання, а для розчинів біомолекул характерні широкі (розмиті) спектри?
5. Переходи між електронними станами молекул виявляються в ультрафіолетовій і видимій областях спектра приблизно від 100 до 1000 нм. Яка енергія цих переходів?
6. Запишіть закон Бугера–Ламберта–Бера, поясніть його фізичний зміст.
7. Визначте коефіцієнт молярної екстинкції.
8. Опишіть основні властивості хромофорів білкових молекул.
9. Проаналізуйте основні властивості хромофорів нуклеїнових кислот.
10. Дайте визначення гіперхромного ефекту. Чому при переході ДНК від полінуклеотиду до моонуклеотидів спостерігається приріст поглинання?

Рекомендована література

1. Костюк П. Г., Зима В. Л., Магура І. С., Мірошніченко М. С., Шуба М. Ф. Біофізика / за ред. П. Г. Костюка. Київ : Обереги, 2001. 544 с.
2. Serdyuk I. N., Zaccai N. R., Zaccai J. Methods in Molecular Biophysics. Structure, Dynamics, Function. Cambridge University Press, New York. 2017. 702 p.
3. Личковський Е. І., Тіманюк В. О., Чалий О. В., Лях Ю. Е., Животова О. М. Біофізика. Фізичні методи аналізу та метрологія / за ред. Е. І. Личковського, В. О. Тіманюка. Вінниця : Нова Книга, 2014. 464 с.
4. Hofmann A., Simon A., Grkovic T., Jones M. Methods of Molecular Analysis in the Life Sciences. Cambridge University Press, New York. 2014. 212 p.
5. Бордун О. М. Оптична спектрофотометрія в біомедичних дослідженнях. Львів : ЛНУ імені Івана Франка, 2008. 272 с.

Лабораторна робота № 2



ВИЗНАЧЕННЯ ДЗЕТА-ПОТЕНЦІАЛУ ДРІЖДЖОВИХ КЛІТИН. МІКРОФЛЮЇДИКА

Мета роботи: вивчити явище електрофорезу біологічних об'єктів.

Підготовка до роботи. Повторити наступні питання:

1. Електричні властивості клітини. Поняття подвійного електричного шару.
2. Особливості поведінки клітин в електричному полі.

Протоплазма клітин, міжклітинна рідина, кров, лімфа являють собою складні колоїдні гетерогенні системи. Під впливом електричного поля в цих системах може спостерігатися рух дисперсної фази щодо дисперсійного середовища. Це явище отримало назву **електрофорез**. Рух частинок в електричному полі обумовлений наявністю у них поверхневого (або об'ємного) заряду, який подібний до руху іонів.

Наявність заряду у частинки зазвичай викликана двома причинами. *Частинка може містити речовини, молекули яких мають хімічні групи, що дисоціюють.* При контакті з водою відбувається дисоціація хімічної групи, і частинка набуває заряду, протилежного по знаку щодо заряду іонної групи, яка відокремилася. Цей заряд має в основному білкову природу, оскільки залежить від дисоціації білкових молекул. *У другому випадку молекули речовини можуть не мати іоноутворюючих груп, але при зіткненні з водним середовищем набувають заряду внаслідок неоднакової адсорбції іонів, що містяться в навколишньому оточенні.* Іони, що визначають заряд поверхні частинки, називаються **потенціалутворюючими**, а навколишні їх протилежно заряджені іони називаються **протиіонами**.

У результаті цього на межі розділу частинка – рідина утворюється просторовий розподіл зарядів протилежного знака, що отримало назву **подвійного електричного шару (ПЕШ)**. Відповідно до сучасної теорії будови подвійного електричного шару (теорія Штерна), одна частина протиіонів знаходиться в безпосередній близькості від міжфазної поверхні (рис. 1) і утворює **адсорбційний шар**, товщина шару не перевищує величину діаметра δ гідратованих іонів, які входять до складу. Адсорбційний шар формується в результаті електростатичної взаємодії **протиіонів** з **потенціалутворюючими** іонами. Інша частина протиіонів знаходиться в дифузійній області ПЕШ, утворюючи **дифузний шар**, товщина якого може бути значною і залежить від складу системи. При збільшенні відстані від шару потенціалутворюючих іонів спостерігається падіння величини поверхневого потенціалу (φ) ПЕШ. Причому в адсорбційному шарі спостерігається лінійне зменшення φ . Порушення лінійної залежності відбувається на межі адсорб-

ційного і дифузного шарів протиіонів (лінія AA). У дифузному шарі φ знижується за експонентою (рис. 1).

Положення межі ковзання в ПЕШ не відомо. Вважають, що межа ковзання проходить або на відстані товщини щільної частини ПЕШ, і в цьому випадку $\zeta = \varphi_a$; або зміщена в рідку фазу, тоді $\zeta < \varphi_d$, де φ_d – потенціал на межі щільна частина ПЕШ – дифузна частина ПЕШ.

Експериментальна оцінка величини потенціалу на межі адсорбційного шару неможлива, оскільки не існує прямих методів вимірювання даної величини. Однак можна виміряти іншу близьку величину – **електрокінетичний потенціал (дзета-потенціал, ζ -потенціал)**. Величина електрокінетичного потенціалу є менш визначеною, але вимірюваною експериментально. **Дзета-потенціал** визначають як потенціал межі ковзання (лінія BB) фаз при їх відносному пересуванні в електричному полі. Електрокінетичний потенціал є однозначною характеристикою електричних властивостей даної межі розділу і визначається експериментально з електрокінетичних явищ, пов'язаних з відносним переміщенням фаз.

Під дією зовнішнього електричного поля, спрямованого уздовж межі розділу, виникає відносне переміщення протилежно заряджених обкладок ПЕШ, що і призводить до відносного руху двох фаз.

При такому підході у визначенні ζ -потенціалу подвійний електричний шар, що оточує частинку, зручно представити у вигляді двох різнойменно заряджених циліндрів, вісь яких колінеарна вектору $\vec{E}$ (рис. 2). Але оскільки товщина подвійного шару набагато менше розмірів частинок, то розгляд можна звести до випадку плоского конденсатора, а електрокінетичний потенціал вважати рівним потенціалу такого конденсатора:

$$\zeta = \frac{d\sigma}{\varepsilon_0\varepsilon}, \quad (1)$$

де d – товщина подвійного електричного шару, [м],
 σ – поверхнева щільність заряду, [Кл/м²],
 ε – діелектрична проникність,
 ε_0 – діелектрична стала, дорівнює $8,85 \cdot 10^{-2}$ Ф/м.

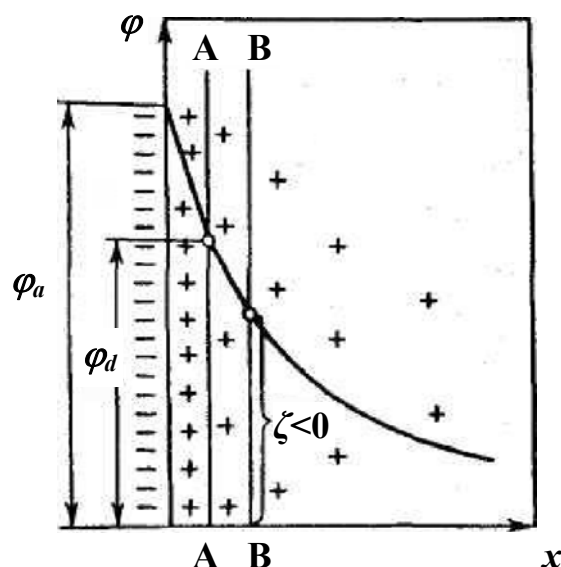


Рис. 1. Сучасна модель будови подвійного електричного шару

З формули (1) видно, що для визначення величини ζ -потенціалу необхідно знати поверхневу щільність заряду на межі розділу середовище-частинка і товщину подвійного електричного шару. Тому безпосереднє вимірювання ζ -потенціалу неможливе, його величину визначають непрямым способом, вимірюючи швидкість руху частинок, що утворюють дисперсну фазу в електричному полі.

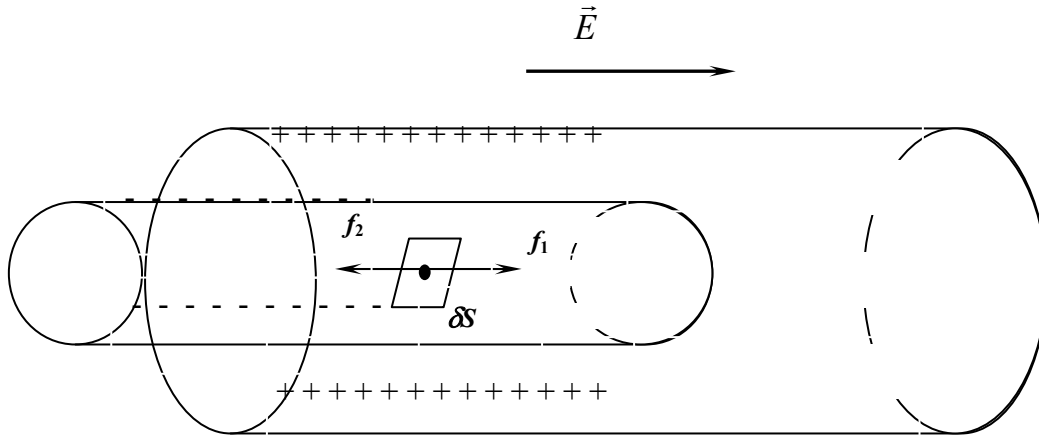


Рис. 2. Схематичне представлення системи сил, що діють на елемент поверхні однієї з обкладок подвійного електричного шару

Розглянемо систему сил, що прикладаються до елемента поверхні δS однією з обкладок подвійного електричного шару. З боку зовнішнього електричного поля $\vec{E}$ діє сила (f_2) $\vec{f}_{el} = \sigma \vec{E}$. Цій силі протидіє сила внутрішнього тертя (f_1) $\vec{f}_{вн.тр.}$ – сила опору переміщенню дотичних шарів рідини відносно один одного, зумовлена дією міжмолекулярних сил зчеплення. Величина цієї сили пропорційна градієнту швидкості відносного переміщення в напрямку r , перпендикулярному напрямку швидкості $\vec{u}$ (рис. 2):

$$\vec{f}_{вн.тр.} = \eta \frac{d\vec{u}}{dr},$$

де η – коефіцієнт в'язкого тертя, або в'язкість.

В умовах рівномірного руху повинен дотримуватися баланс сил $f_{el} = -f_{вн.тр.}$, тобто

$$\vec{E}\sigma = \eta \frac{d\vec{u}}{dr}. \quad (2)$$

У першому наближенні можна вважати, що швидкість течії в області подвійного шару змінюється лінійно з відстанню і тоді $\left| \frac{\partial \vec{u}}{\partial r} \right| = \frac{u}{d}$.

З урахуванням цього з (2) можна виразити σ :

$$\sigma = \frac{\eta u}{Ed}. \quad (3)$$

Підставивши вираз (3) для σ в формулу (1) для ζ -потенціалу, отримуємо формулу Смолуховського:

$$\zeta = \frac{\eta}{\varepsilon \varepsilon_0} \cdot \frac{u}{E}. \quad (4)$$

Відношення лінійної швидкості u до напруженості поля E називається **електрофоретичною швидкістю** w , що має розмірність $[m^2/c \cdot V]$. В якості значень ε і η можна взяти значення діелектричної проникності і в'язкості для води при 20 °C:

$$\varepsilon = 81, \quad \eta = 10^{-3} H \cdot c / m^2.$$

З урахуванням цих значень формула (4) матиме вигляд:

$$\zeta = \frac{10^{-3} H \cdot c / m^2}{8,85 \cdot 10^{-12} \Phi / m \cdot 81} \cdot w \approx 1,395 \cdot 10^6 \frac{H \cdot c}{\Phi \cdot m} \cdot w \quad (4a)$$

Таким чином, визначення ζ -потенціалу зводиться до визначення електрофоретичної швидкості. Оскільки $u = s/t$, де s – шлях [м], який проходить частинка за час t [с], а напруженість E можна визначити як градієнт потенціалу електричного поля, тобто падіння напруги на одиницю довжини провідника $E = V/l$, де V – падіння напруги [В] між електродами в електрофоретичній камері, l – відстань [м] між кінцями електродів, то в практичних цілях зручно користуватися формулою:

$$\zeta = 1,395 \cdot 10^6 \frac{sl}{tV} \quad (4б)$$

Оскільки $1\Phi = \frac{1Kл}{1В}$, а $1H = \frac{1В \cdot Kл}{м}$, то розмірність коефіцієнта виражається як $\left[\frac{B^2 \cdot c}{m^2} \right]$. При підстановці всіх значень у формулу (4б) у зазначених розмірностях величина ζ -потенціалу виражається у Вольтах.

Опис установки для мікроелектрофорезу

Для визначення електрофоретичної швидкості відносно крупних частинок, показник заломлення яких в достатній мірі відрізняється від показника заломлення середовища, застосовують мікроскопічний метод спостереження електрофорезу. На рис. 3 зображені установка і камера для мікроелектрофорезу. Мікроелектрофоретична камера являє собою пред-

метне скло із запаяними електродами, приєднаними до джерела постійного струму. Камера з електродами розміщується на предметному столику мікроскопа.

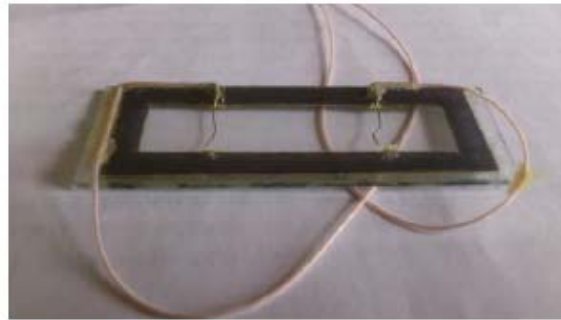


Рис. 3. Установка і камера для мікроелектрофорезу

Електрична схема установки для дослідження електрофорезу показана на рис. 4. Джерело постійного струму 1 має плавне регулювання, яке здійснюється за допомогою потенціометра 2, а зміна напрямку струму здійснюється перемиканням комутатора 6. Для контролю струму в ланцюзі використовується міліамперметр 4. Вимірювання напруги проводиться за допомогою вольтметра 3.

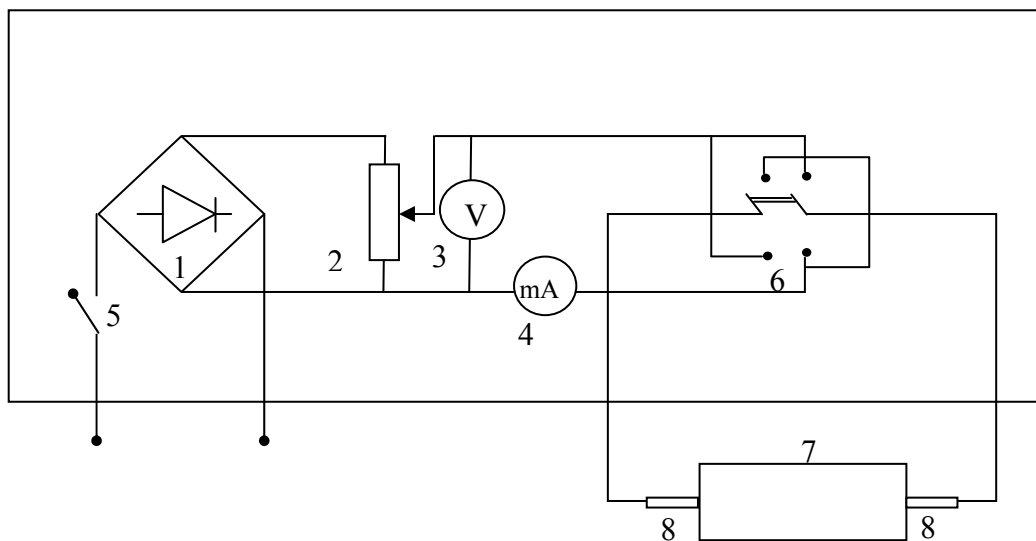


Рис. 4. Електрична схема установки для мікроелектрофорезу:
1 – джерело постійного струму; 2 – потенціометр;
3 – вольтметр; 4 – міліамперметр; 5 – вимикач; 6 – комутатор;
7 – камера; 8 – електроди, що не поляризуються

Виконання роботи

Лабораторне обладнання, приладдя та матеріали: мікроскоп, окуляр-мікромір, об'єкт-мікромір, установка для електрофорезу, секундомір, 10 % розчин KCl, 8 % розчин сахарози, 0,1 М розчин лимонної кислоти, 0,2 М розчин Na_2HPO_4 , суспензія дріжджових клітин.

Завдання 1. Визначення електрофоретичної швидкості і ζ -потенціалу дріжджових клітин.

1. Проградувати окулярну сітку. Для градування використовують об'єкт-мікрометр, який являє собою предметне скло, на поверхню якого нанесена еталонна мікрометрична шкала з відомою ціною поділу. Об'єкт-мікрометр поміщають на предметний столик мікроскопа, потім, повертаючи окуляр в тубусі мікроскопа і пересуваючи об'єкт-мікрометр, поєднують напрямки штрихів сітки з напрямком штрихів об'єкт-мікрометра. Поєднавши один зі штрихів сітки з одним зі штрихів шкали об'єкт-мікрометра, визначають, скільки поділок об'єкт-мікрометра перекривається певним числом поділок сітки. Ціна поділки сітки x визначається за формулою:

$$x = \frac{n}{m} \cdot a, \quad (5)$$

де a – ціна поділки об'єкт-мікрометра,
 n – число поділок сітки,
 m – число поділок об'єкт-мікрометра.

2. Зібрати установку, як показано на рис. 3. Камера для електрофорезу поміщається на предметний столик мікроскопа і накривається покривним склом.

3. Невеликий шматочок дріжджів помістити в забуферений 8 % розчин сахарози і ретельно розмішати. Забуферювання провести цитратним буфером, приготованим за Мак-Ільвеном. Буфер додавати з розрахунку 0,5 мл буфера на 4,5 мл сахарози. Краплю суспензії помістити в камеру для електрофорезу, накрити покривним склом. Якщо в полі зору виявиться дуже багато дріжджових клітин, суспензію потрібно розбавити 8 % розчином сахарози.

Спостереження електрофорезу проводять на певній глибині, що дорівнює половині висоти камери, де частинки суспензії відносно рухливі. Для визначення глибини камери фокусують об'єкти за допомогою мікрогвинта мікроскопа спочатку на покривне скло, а потім на дно камери. Відзначають в тому й іншому випадку положення мікрогвинта. Потім встановлюють мікрогвинт в середнє положення.

4. Переконалися у відсутності спрямованого руху клітин при розімкненому ланцюзі. Замкнути ланцюг і встановити за допомогою потенціометра силу струму, яка дорівнює 2–6 мА. Переконалися в наведеному переміщенні клітин і в зміні напрямку руху клітин на зворотний при перемиканні напрямлення електричного струму. Виміряти швидкість руху дріжджових клітин при прямому і зворотному напрямках руху не менше 5 разів. Результати занести в таблицю і обчислити середнє за всіма даними значення швидкості.

5. Виміряти відстань між кінчиками електродів за допомогою міліметрового паперу.

6. Відзначити силу струму I_1 і падіння напруги в ланцюзі V_1 .

7. Закоротити електроди шляхом заміни в камері розчину сахарози на насичений розчин KCl. Встановити за допомогою потенціометра колишню силу струму в ланцюзі I_1 . Записати значення падіння напруги в ланцюзі без падіння напруги в комірці V_2 .

8. Визначити падіння напруги в комірці V :

$$V = V_1 - V_2. \quad (6)$$

9. Обчислити електрофоретичну швидкість w і за формулою (4а) визначити значення ζ -потенціалу дріжджових клітин.

Завдання 2. Визначення ізоелектричної точки дріжджових клітин.

Ізоелектрична точка є характерним показником фізико-хімічних властивостей поверхні клітини. Залежно від концентрації потенціалутворюючих іонів і протиіонів, що специфічно адсорбуються, значення електрокінетичного потенціалу ζ може мінятися від позитивного до негативного та дорівнює нулю в *ізоелектричній точці*. Якщо специфічна адсорбція протиіонів відсутня, то ізоелектрична точка збігається з потенціалом нульового заряду поверхні.

Величина ζ -потенціалу в нормі відносно постійна для поверхні даного виду клітини. Однак ця величина може зазнавати змін при дії на клітину різноманітних пошкоджуючих факторів: електромагнітного випромінювання, поверхнево активних речовин, антибіотиків тощо. Тому певні значення величин ζ -потенціалу використовують для оцінки функціонального або патологічного стану клітин чи одноклітинних організмів.

Шляхом визначення електрофоретичної швидкості в широкому діапазоні значень рН можна отримати *іонний спектр* частинок, який дозволяє судити про те, чим обумовлений заряд клітинної поверхні – іонізацією груп, що дисоціюють, або адсорбцією якихось іонів. Виходячи з цих даних, можна зробити висновок про стан поверхні частинки.

Оскільки **ізоелектрична точка** – це те значення рН, при якому клітини мають найменший заряд, сенс роботи зводиться до визначення значення рН, *при якому частинки будуть рухатися в електричному полі з мінімальною швидкістю*.

1. Приготувати 5 розчинів, кожен з яких містить 9 об'ємів (4,5 мл) 8 % розчину сахарози і 1 (0,5 мл) об'єм буферного розчину за Мак-Ільвеном (таблиця 1) зі значеннями рН: 2,6; 3,5; 4,6; 5,8; 8,0.

Таблиця 1

Суміш Мак-Ільвена

pH	Na ₂ HPO ₄ , мл	CHO, мл	pH	Na ₂ HPO ₄ , мл	CHO, мл
2,2	0,2	9,8	5,2	5,36	4,64
2,4	0,62	9,38	5,4	5,58	4,42
2,6	1,09	8,91	5,6	5,80	4,20
2,8	1,58	8,42	5,8	6,05	3,95
3,0	2,05	7,95	6,0	6,31	3,69
3,2	2,47	7,53	6,2	6,61	3,39
3,4	2,85	7,15	6,4	6,92	3,08
3,6	3,22	6,78	6,6	7,28	2,72
3,8	3,55	6,45	6,8	7,72	2,28
4,0	3,85	6,15	7,0	8,24	1,76
4,2	4,13	5,86	7,2	8,69	1,31
4,4	4,41	5,59	7,4	9,08	0,82
4,6	4,68	5,32	7,6	9,36	0,64
4,8	4,93	5,07	7,8	9,57	0,43
5,0	5,15	4,85	8,0	9,72	0,28

2. У приготовані розчини помістити дріжджові клітини. Для всіх п'яти розчинів провести вимірювання, аналогічні тим, які виконувалися в завданні 1. Виміряти швидкість руху дріжджових клітин при прямому і зворотному напрямках руху не менше 5 разів.

Рухливість клітин необхідно визначати при постійній силі струму.

Результати лабораторної роботи представити у вигляді таблиці 2. Виконати статистичну обробку даних.

Таблиця 2

Електрофоретичні характеристики дріжджових клітин

pH	I , mA	V , mV	s , мм	t , с	ζ , mV	$\bar{\zeta}$	σ	$\bar{\zeta} \pm \Delta x_{0,95}$
Завдання 1								
5.0								
Завдання 2								
2.6								
3.5								
4.6								
5.8								
8.0								

- Розрахувати середнє значення ζ -потенціалу: $\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$,

де x – виміряна величина, n – число вимірювань.

- Розрахувати σ – середньоквадратичне відхилення ζ -потенціалу

$$\sigma = \sqrt{\sum_{i=1}^n \frac{\Delta x_i^2}{n-1}}.$$

- Визначити значення коефіцієнта Стюдента (t) за допомогою таблиці 3 і з урахуванням числа вимірів (n) і довірчої ймовірності ($\alpha=0,95$) обчислити довірчий інтервал:

$$\bar{x} - \Delta x_{0,95} < \mu < \bar{x} + \Delta x_{0,95}, \quad \Delta x_{0,95} = t \cdot \frac{\sigma}{\sqrt{n}}.$$

Таблиця 3

Значення коефіцієнтів Стюдента (t)

N	Довірча ймовірність			n	Довірча ймовірність		
	0,95	0,99	0,999		0,95	0,99	0,999
2	12,7	63,7	636,6	14	2,2	3,0	4,3
3	4,3	9,9	31,6	15	2,1	3,0	4,1
4	3,2	5,8	12,9	16	2,1	2,9	4,0
5	2,8	4,6	8,6	17	2,1	2,9	4,0
6	2,6	4,0	6,9	18	2,1	2,9	4,0
7	2,4	3,7	6,0	19	2,1	2,9	4,0
8	2,4	3,5	5,0	20	2,1	2,9	3,9
9	2,3	3,4	5,0	25	2,1	2,8	3,7
10	2,3	3,3	4,8	30	2,0	2,8	3,7
11	2,2	3,2	4,6	60	2,0	2,7	3,5
12	2,2	3,1	4,5	120	2,0	2,6	3,4
13	2,2	3,1	4,3				

Завдання 3. Зробити висновки.

Завдання 4. Розв'язати задачі.

1. Електрофоретична рухливість еритроцитів складає $1 \cdot 10^{-12} \text{ м}^2 \text{В}^{-1} \text{с}^{-1}$, а гранулоцитів $0,6 \cdot 10^{-12} \text{ м}^2 \text{В}^{-1} \text{с}^{-1}$ при електрофорезі за таких самих умов. У скільки разів ζ -потенціал гранулоцитів відрізняється від ζ -потенціалу еритроцитів?

2. Визначити відстань від поверхні еритроцита в глибину об'єму розчину, на якій потенціал зменшується в e раз при температурі 23°C , якщо концентрація NaCl складає 9% .

3. За допомогою електрофорезу досліджують два види карбоксигемоглобіну: нормальний та патологічний, з серповидних еритроцитів. За 14 годин на електрофореграмі пройшло розділення цих двох білків. Патологічний карбоксигемоглобін віддалився на 1 см від нормального при напруженості поля $5 \cdot 10^2 \text{ Вт/м}$. Якою буде електрофоретична рухливість

патологічного карбоксигемоглобіну, якщо рухливість нормального $2,2 \cdot 10^{-9} \text{ м}^2/\text{В} \cdot \text{с}$?

4. За допомогою електрофорезу в поліакриламідному гелі в присутності додецилсульфату натрію для деяких відомих білків отримані значення електрофоретичної рухливості (u):

міоглобін	$M_1=17200 \text{ Да}$	$u_1=0,95$;
трипсин	$M_2=23300 \text{ Да}$	$u_2=0,82$;
фумараза	$M_3=49200 \text{ Да}$	$u_3=0,50$.

Використовуючи ці дані, знайти M_x невідомого білка, якщо його електрофоретична рухливість $u_x=0,6$. Побудувати графік залежності $u=f(\lg M)$.

Примітка: врахувати, що для електрофорезу білків у поліакриламідному гелі в присутності додецилсульфату натрію встановлений взаємозв'язок між електрофоретичною рухливістю та молекулярною масою білка: $u=b-a \lg M$, де a, b – константи, які залежать від властивостей поліакриламідного гелю.

5. При $\text{pH}=6,5$ електрофоретична рухливість оксигемоглобіну дорівнює $2,23 \cdot 10^{-5} \text{ см}^2/\text{В} \cdot \text{с}$. Розрахувати, скільки необхідно часу для розділення цих двох білків на відстань 2 см при напруженості електричного поля 7,0 В/см.

6. Відносна електрофоретична рухомість (u) деяких білків у поліакриламідному гелі з додецилсульфатом натрію така:

Білок	M , г/моль	u
Міоглобін	17200	0,95
Трипсин	23300	0,82
Альдолаза	40000	0,59
Фумараза	49200	0,5
Карбоангідраза	29000	0,73

Побудувати графік залежності $u=f(\lg M)$. Знайти молекулярну масу креатинкінази, якщо електрофоретична рухливість складає 0,6. Молекулярна маса цього білка визначена за методом ультрацентрифугування $g=80000$. Порівняйте дані, зробіть висновки.

Завдання 5. Виконати тестові завдання.

1. Швидкість руху частинок в електричному полі визначається за формулою:

$$\text{a) } u = \frac{\zeta \varepsilon}{4\pi\eta} \cdot \frac{E}{l}; \quad \text{b) } u = \frac{\zeta \varepsilon}{4\pi\eta} \cdot \frac{l}{E}; \quad \text{c) } u = \frac{\varepsilon \varepsilon_0}{4\pi\eta} \cdot \frac{l}{E}; \quad \text{d) } u = \frac{\zeta}{4\pi\eta} \cdot \frac{E}{l}.$$

2. Фактори, що впливають на електричний заряд клітини:

a) температура довкілля клітини;

- b) напруженість електричного поля;
- c) рН довкілля клітини;
- d) тиск довкілля клітини.

3. Якими групами, що дисоціюють, обумовлений заряд клітинної поверхні:

- a) аміногрупами;
- b) фосфатними групами;
- c) залишками сіалових кислот;
- d) аміногрупами, фосфатними групами, залишками сіалових кислот?

4. Чому змінюється електрофоретична швидкість руху клітини зі зміною рН середовища:

- a) під дією рН змінюється маса клітини;
- b) під дією рН змінюється напруженість електричного поля;
- c) під дією рН змінюється перерозподіл зарядів на поверхні клітини;
- d) значення рН середовища не впливає на рухливість клітини?

5. Як залежить величина ζ -потенціалу клітини від її електрофоретичної рухливості:

- a) $\zeta = \frac{\eta \varepsilon_0}{\varepsilon} \cdot u$;
- b) $\zeta = \frac{\varepsilon \varepsilon_0}{\eta u}$;
- c) $\zeta = \frac{u}{\eta \varepsilon \varepsilon_0}$;
- d) $\zeta = \frac{\eta}{\varepsilon \varepsilon_0} \cdot u$?

6. Як іонна проникність біологічної мембрани може впливати на величину ζ -потенціалу клітини:

- a) зі зростанням проникності біологічної мембрани зростає ζ -потенціал клітини;
- b) зі зростанням проникності біологічної мембрани зменшується ζ -потенціал клітини;
- c) зі зменшенням проникності біологічної мембрани зменшується ζ -потенціал клітини;
- d) ζ -потенціал клітини не залежить від іонної проникності біологічної мембрани?

7. Виберіть неправильне твердження про властивості клітинної мембрани:

- a) ліпіди спонтанно утворюють бішар;
- b) мембранні ліпіди і білки дифундують в площині мембрани;
- c) обидві сторони мембрани ідентичні одна одній і симетричні;
- d) в різних ділянках ліпідного бішару мембрани мають різну густину.

8. Дайте визначення: ізоелектрична точка – це:

- a) значення температури середовища, при якому клітини мають сумарний заряд поверхні, близький до нуля;
- b) значення температури середовища, при якому клітини мають мінімальну електрофоретичну рухливість;

с) значення рН, при якому клітини мають сумарний заряд поверхні, близький до нуля;

д) значення рН, при якому клітини мають мінімальну електрофоретичну рухливість.

9. Ліпіди в складі клітинної мембрани знаходяться в стані:

а) твердому аморфному стані;

б) твердокристалічному стані;

с) в рідкому аморфному стані;

д) рідкокристалічному стані.

10. Носіями зарядів на поверхні мембрани є:

а) іонізовані аміногрупи в складі біомакромолекул;

б) іонізовані карбоксильні групи в складі біомакромолекул;

с) потік іонів через клітинну мембрану;

д) будь-які іоногенні групи в складі біомембрани.

Контрольні питання

1. Чим визначається поверхневий заряд клітини?

2. За яких умов дріжджові клітини рухатимуться до анода, до катода, залишаться нерухомими?

3. Що таке ζ -потенціал?

4. Дайте визначення явища електрофорезу.

5. Від чого залежатиме електрофоретична швидкість клітини?

6. Що таке ізоелектрична точка?

7. Дайте порівняльну характеристику поверхневого потенціалу і ζ -потенціалу.

8. Які відомості можна отримати про властивості поверхні частинки шляхом визначення її ζ -потенціалу, електрофоретичної швидкості, ізоелектричної точки?

9. Як реагують на зміну рН середовища іоногенні групи біомакромолекул?

10. Як змінюється перерозподіл заряджених груп на поверхні біомембран зі зміною рН?

11. Як з діагностичною метою можна використати величину ζ -потенціалу?

Рекомендована література

1. Костюк П. Г., Зима В. Л., Магура І. С., Мірошніченко М. С., Шуба М. Ф. Біофізика / за ред. П. Г. Костюка. Київ : Обереги, 2001. 544 с.

2. Мчедлов-Петросян М. О., Лебідь В. І., Глазкова О. М., Лебідь О. В. Колоїдна хімія / за ред. М. О. Мчедлова-Петросяна. Харків : ХНУ імені В. Н. Каразіна, 2012. 500 с.

3. Levine S., Levine M., Sharp K. A., Brooks D. E. Theory of the electrokinetic behavior of human erythrocytes. Biophysical Journal. 1983. Vol. 2. P. 127-135.

Лабораторна робота № 3



ВЗАЄМОДІЯ ФЛУОРЕСЦЕНТНИХ БАРВНИКІВ З КОМПОНЕНТАМИ КЛІТИНИ

Мета роботи: ознайомитися з методом люмінесцентної мікроскопії і вивчити вторинну люмінесценцію біооб'єктів за умов дії зовнішніх чинників.

Підготовка до роботи. Повторити наступні питання:

1. Квантово-механічне тлумачення флуоресценції. Схема електронних переходів при поглинанні кванта світла речовиною. Закон Стокса. Правило Каші.
2. Поняття люмінесценції: первинна та вторинна люмінесценція біооб'єктів.
3. Механізми взаємодії флуорофорів з біооб'єктами.

Люмінесцентна мікроскопія базується на здатності речовини поглинати, а потім випромінювати електромагнітну енергію. *Інтенсивність люмінесценції пропорційна інтенсивності світла, що збуджує люмінесценцію, та кількості речовини, яка здатна до люмінесценції.*

За умов дослідження біологічних об'єктів люмінесцентна мікроскопія є зручним високочутливим методом кількісного і якісного аналізу речовин, які здатні до люмінесценції. Зокрема метод дозволяє вивчати такі процеси, як денатурацію або комплексоутворення білків. Слід зазначити, важлива перевага методу люмінесцентної мікроскопії у тому, що вимірювання люмінесценції можливе без пошкодження біологічних об'єктів та ходу біологічних процесів. І, нарешті, дослідження може здійснюватися в гетерогенних середовищах, здатних до розсіювання, якими, зазвичай, є біологічні об'єкти.

Широке застосування в біофізиці люмінесцентного аналізу пояснюється тим, що вивчення люмінесценції дає значущу інформацію про природу процесів, які відбуваються на молекулярному рівні в білках і нуклеїнових кислотах. Ці процеси пов'язані з електронними переходами між різними енергетичними рівнями в межах молекули.

Кожна молекула характеризується набором дискретних енергетичних станів (рис. 1). Найнижчий енергетичний рівень S_0 , названий **основним**, відповідає найменшому значенню енергії E_0 , якою може володіти окремий атом чи молекула. Енергетичні рівні з більш високим значенням енергії E_1 називаються **збудженими** S_1 . Поглинання енергії електромагнітної хвилі атомами або молекулами призводить до переходу електрона з основного рівня на збуджений. Поглинання енергії відбувається окремими порціями – **квантами**. Так, при переході з рівня S_0 на S_1 енергія

поглиненого кванта $h\nu$ дорівнює різниці енергій відповідних рівнів, між якими здійснюється перехід:

$$h\nu = E_1 - E_2, \quad (1)$$

де h – постійна Планка; ν – частота електромагнітної хвилі.

У звичайних умовах молекула, як правило, знаходиться в основному **синглетному** стані S_0 . В синглетному стані сумарний спін електронів дорівнює нулю. **Мультиплетність** стану молекули визначається сумарним спіном електронів S і дорівнює $2S+1$. Таким чином, при $S=0$ мультиплетність дорівнює 1, і тому такий стан називається **синглетним**. Для більшості молекул в основному стані всі електрони, які знаходяться на молекулярних орбіталях, спарені.

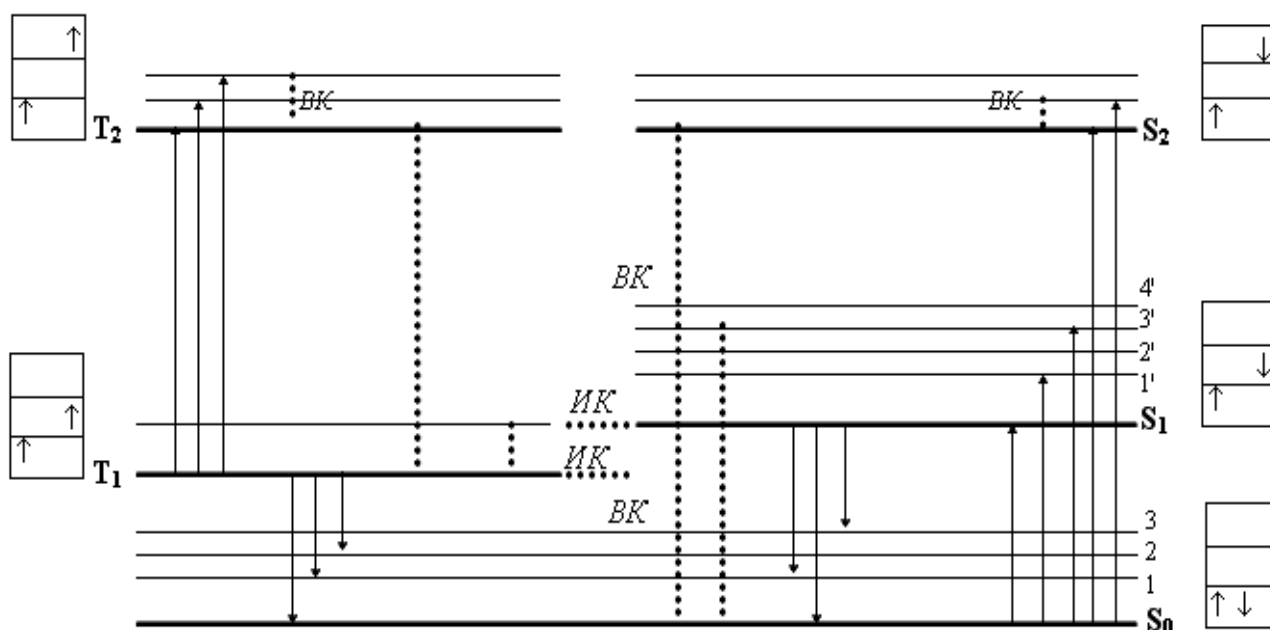


Рис. 1. Схема електронних переходів у молекулах:

S_0 – основний (незбуджений) стан; S_1 , S_2 і T_1 , T_2 – збуджений синглетний і триплетний стан, відповідно; біля кожного рівня показано напрямки збудженого спіна по відношенню до спіна електрона, що залишився; прямі стрілки поглинальні та випромінювальні переходи, переривчасті – безвипромінювальні переходи; ВК – внутрішня конверсія (переходи електрона без переорієнтації спіна); ІК – інтеркомбінаційна конверсія (переходи електрона з переорієнтацією спіна)

Оскільки спарені електрони мають **антипаралельну** орієнтацію спінів, то їх сумарний спін дорівнює нулю. При поглинанні кванта сумарний спін, як правило, не змінюється. Тому якщо основний стан синглетний, то поглинений фотон переводить молекулу в синглетний збуджений стан.

Поглинання фотона відбувається за час близько 10^{-15} с, протягом наступних 10^{-12} с встановлюється теплова рівновага збудженої молекули з навколишнім середовищем. Перебуваючи у збудженому стані S_1 протягом

$10^{-10} \div 10^{-8}$ с, молекула може здійснити перехід в основний синглетний стан без випромінювання енергії (відбувається перерозподіл енергії збудженого стану на тепловий рух оточуючих молекул) або з випромінюванням кванта світла з вірогідністю q або p , відповідно. Випромінювальний перехід $S_1 \rightarrow S_0$ називається флуоресценцією.

Початковий перехід молекули зі збудженого стану здійснюється на коливальні підрівні основного стану (рис. 1), які мають енергію дещо більше, ніж E_0 , а, отже, енергія випромінюваного кванта буде меншою, ніж поглиненого. Таким чином, довжина хвилі випромінюваного світла виявляється більшою довжини хвилі збуджуючого кванта. Це твердження лягло в основу **закону Стокса**, встановленого емпіричним шляхом, згідно з яким **довжина хвилі люмінесценції завжди більше довжини хвилі збуджуючого світла**.

Випромінювання квантів світла завжди відбувається з нижнього збудженого рівня молекули, незалежно від того, на який рівень здійснив перехід електрон в результаті поглинання фотона. Це означає, що при збудженні молекули будь-якою довжиною хвилі (різні вертикальні стрілки вгору на рис. 1) випромінювання буде відбуватися з одного і того ж стану молекули і спектр люмінесценції у всіх випадках буде однаковим. Отже, **спектр люмінесценції не залежить від довжини хвилі збуджуючого випромінювання**, на цьому твердженні базується **правило Каші**.

Одним з найважливіших параметрів люмінесценції молекули є її **квантовий вихід k** , який визначається як відношення числа квантів люмінесценції до числа поглинутих молекулою квантів збуджуючого випромінювання. Квантовий вихід характеризує співвідношення ймовірностей випромінювальних і безвипромінювальних процесів. За відсутності безвипромінювальних переходів у системі кількість поглинутих квантів дорівнює числу квантів люмінесценції, і, відповідно, величина квантового виходу буде дорівнювати одиниці. Але найчастіше в системі відбуваються такі явища, як передача енергії збудження на інші молекули, фотохімічні реакції, розсіювання енергії у вигляді тепла в навколишнє середовище. Ці процеси зменшують імовірність випромінювальних переходів. За таких умов квантовий вихід буде менше одиниці.

Нижче синглетного рівня S_1 знаходиться рівень енергії, який відповідає триплетному стану T_1 . Рівень T_1 є **метастабільним**, оскільки час життя триплетного стану вельми великий $\sim 10^{-3} \div 10$ с. Зі стану T_1 молекула може перейти в основний стан S_0 як з випромінюванням, так і без випромінювання енергії з вірогідністю π і q_2 , відповідно. Перехід $T_1 \rightarrow S_0$ супроводжується зміною орієнтації спіна, тобто є забороненим, і має дуже малу вірогідність. Оскільки ймовірність переходу обернено пропорційна періоду життя, то мала ймовірність переходу $T_1 \rightarrow S_0$ обумовлює досить

великий час життя збудженого стану T_1 . Такий випромінювальний перехід $T_1 \rightarrow S_0$ називається **фосфоресценцією**.

Обидва процеси, як флуоресценція, так і фосфоресценція, об'єднуються під загальною назвою – **люмінесценція**.

У люмінесцентній мікроскопії розрізняють **первинну** і **вторинну** люмінесценцію. **Первинна**, або **природна**, люмінесценція властива невеликій групі речовин. Первинна люмінесценція біологічних об'єктів зумовлена присутністю в білкових молекулах залишків триптофану, які мають здатність поглинати на довжині хвилі 280 нм і випромінюють в діапазоні 320–340 нм. Для інших біомолекул характерна наступна люмінесценція: для хлорофілу – яскраво-червона, для вітаміну А – зелена або жовта флуоресценція; ліпофусцин в гепатоцитах випромінює коричневим, а в клітинах наднирників – коричнево-червоним кольором; пеніцилін має зелену люмінесценцію.

Більшість речовин у біологічних об'єктах не здатні флуоресціювати. Специфічне світіння таких об'єктів в люмінесцентному мікроскопі забезпечується додаванням спеціальних барвників – **флуорофорів**. В якості флуорофорів виступають ароматичні органічні сполуки (наприклад, феноли, аміни), які здатні флуоресціювати. Флуорофори з'єднуються з досліджуваними речовинами різними способами: електроадсорбцією, утворюють сполуки типу солей або просто розчиняються в них, в такий спосіб викликаючи світіння об'єктів під ультрафіолетовим світлом – **вторинну люмінесценцію**.

Молекула речовини, яка здатна до люмінесценції, взаємодіючи зі специфічно організованими біологічними макромолекулами і їх комплексами, різко збільшує свій квантовий вихід. Наприклад, барвник аурамін практично не випромінює у водному розчині за рахунок великої власної рухливості і безвипромінювального розсіювання енергії, після взаємодії з білком молекулярна структура барвника набуває жорсткості і як наслідок – набуває високого квантового виходу.

Серед флуорофорів широко застосовуються **катионні** флуорофори (акридіновий помаранчевий, аурамін), молекули яких мають позитивно заряджену групу, і **аніонні** (уранін, АНС), що несуть на собі негативний заряд.

Опис оптичної системи люмінесцентного мікроскопа

Оптична система люмінесцентного мікроскопа МЛ-2 передбачає можливість спостереження об'єктів як *в світлі*, тобто при освітленні об'єктів знизу через конденсор, так і *в світлі люмінесценції* при освітленні об'єктів зверху через об'єктив. Можливість освітлення об'єктів зверху має переваги в порівнянні з освітленням знизу, через конденсор, оскільки при цьому значно підвищується яскравість і контрастність зображення для мутних і товстих прозорих об'єктів.

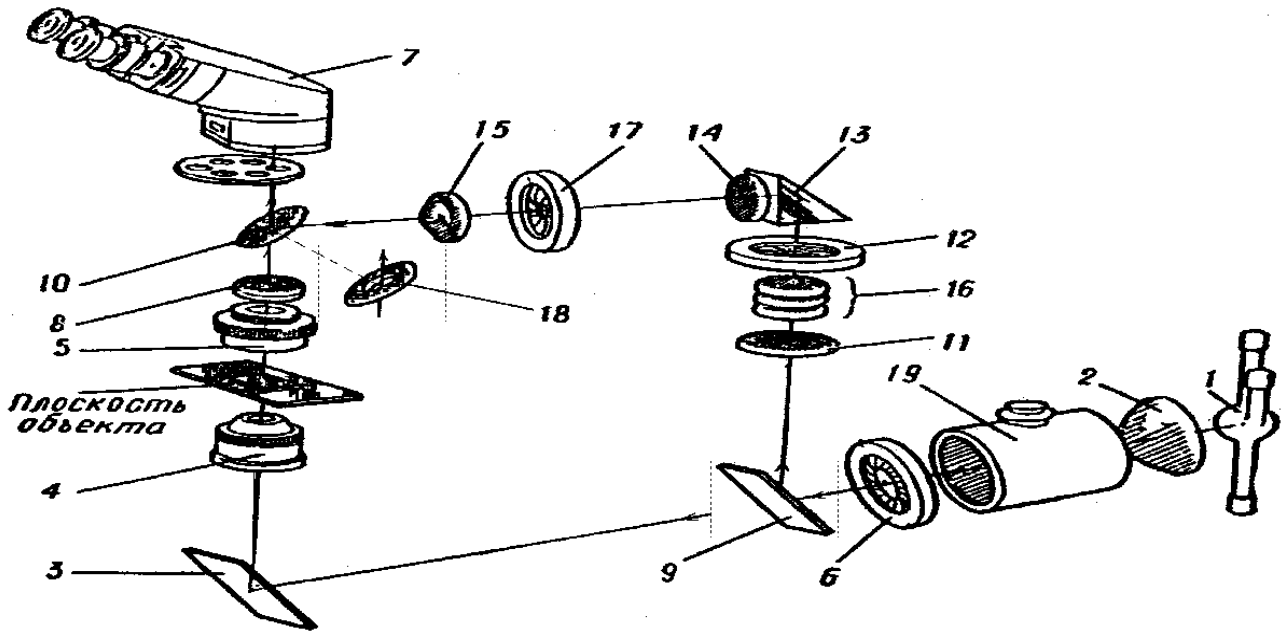


Рис. 2. Оптична схема мікроскопа МЛ-2

Схема оптичної системи мікроскопа зображена на рис. 2. Люмінесцентний мікроскоп складається з тих же основних елементів, що і звичайний світловий мікроскоп, але має більш потужне джерело ультрафіолетового світла та спеціальні світлофільтри. В люмінесцентному мікроскопі в якості джерела світла 1 застосовується ртутна лампа, що дає інтенсивне випромінювання в синьо-фіолетовій області спектра і в ближній ультрафіолетовій частині спектра до довжини хвилі 340 нм.

При освітленні об'єктів знизу здійснюється проекція зображення джерела світла 1 за допомогою колекторної лінзи 2 і дзеркала 3 в площину ірисової апертурної діафрагми конденсора 4 і далі лінзами конденсора і об'єктива 5 – у вихідний окуляр об'єктива. Польова діафрагма 6 дзеркалом 3 і конденсором 4 проектується на площину досліджуваного об'єкта, зображення якого за допомогою об'єктива і кільцевого дзеркала 18 проектується на предметну площину бінокулярної насадки 7. Додатково вхід променів вводиться коригуюча ахроматична лінза 8, яка дає збільшення системи в 1,2 рази.

При освітленні об'єктів зверху вхід променів включається дзеркало 9 і світлорозподільна пластинка 10. У цьому випадку зображення джерела світла 1 за допомогою колекторної лінзи 2, дзеркала 9 і лінзи 11 проектується в площину апертурної діафрагми 12. Зображення апертурної діафрагми 12 за допомогою призми 13, лінз 14, 15 і світлорозподільної пластинки 10 проектується у вихідний окуляр об'єктива. У свою чергу зображення польової діафрагми 17 проектується лінзами 15, світлорозподільною пластинкою 10 і об'єктивом 5 на площину досліджуваного об'єкта. Світлорозподільна пластинка 10, яка має спеціальне інтерферен-

ційне покриття, переважно відображає промені з довжиною хвилі $360\div 440$ нм і пропускає промені з довжиною хвилі $440\div 700$ нм, в результаті чого світло флуоресценції об'єкта, проходячи через об'єktiv 5, потраплятиме в біокулярну насадку 7.

Для виділення із загального випромінювання певних ділянок спектра використовуються світлофільтри 16. Для збудження люмінесценції УФ променями застосовуються фільтри зі скла УФС6 (максимум пропускання $\lambda=365$ нм). Світлофільтри зі скла УФС6 рекомендується застосовувати в основному при вивченні первинної люмінесценції, а також у тому випадку, коли важливо отримати в зображенні більшу різноманітність кольорів. Для більшості досліджень при вивченні вторинної люмінесценції біопрепаратів достатньо використовувати для збудження світлофільтри, що пропускають синьо-фіолетову область спектра, наприклад, світлофільтри зі скла ФС1 або СС15 (максимум пропускання 400 нм).

Для запобігання нагрівання світлофільтра 16 від ртутної лампи після колекторної лінзи встановлюється кювета 19, заповнена дистильованою водою або слабким розчином мідного купоросу.

Виконання роботи

Лабораторне обладнання та матеріали: люмінесцентний мікроскоп, предметне та покривне скло, скляні палички, автоматичні піпетки, клітинна суспензія (дріжджі), розчин KCl (1,34 М), розчин акридінового помаранчевого (1:10000), розчин ураніну (1:10000).

Завдання 1. Спостереження вторинної люмінесценції клітин, пофарбованих катіонним та аніонним флуорофорами.

1. Уважно ознайомитися з конструкцією, призначенням та розташуванням систем регулювання мікроскопа МЛ–2.

2. Підготувати мікроскоп для спостереження об'єктів *при освітленні їх зверху*, встановивши необхідні світлофільтри (залежно від особливостей об'єктів, що вивчаються, і застосованих флуорофорів) і рукоятки перемикання у відповідні положення, ввести в хід променів світлорозподільну пластину, для чого рукоятку $ТП\leftrightarrow Л$ поставити у положення $Л$, ввести в хід променів дзеркало 9 (рис. 2), витягнувши до упору рукоятку **ВІДОБРАЖЕНЕ СВІТЛО**.

3. Приступити до приготування препарату «роздавлена крапля». Для цього каплю флуорофору акридінового помаранчевого (АП) нанести на предметне скло. Помістити в краплю невелику кількість клітин. Краплю накрити покривним склом і обережно, але щільно придавити покривне скло до предметного. На тому ж предметному склі приготувати аналогічний препарат, але в якості флуорофору обрати уранін (У).

4. Розташувати предметне скло з препаратом на предметний столик мікроскопа. Видалити світлофільтр 16. За допомогою ручок грубого і плавного налаштування сфокусувати мікроскоп на біопрепараті. Після фокусування мікроскопа на досліджуваний об'єкт і візуалізації його в об'єктиві мікроскопа вставити на місце світлофільтр, провести, якщо необхідно, плавне налаштування фокусу і відзначити колір люмінесценції клітин. Здійснити спостереження вторинної люмінесценції клітин, зумовленої як (АО), так і (У). Пояснити відмінності в спостереженнях і зробити висновок про заряд поверхні клітини.

Завдання 2. Спостереження вторинної люмінесценції клітин, які зазнали дії фізичного чинника.

1. Піддати дії фізичного чинника суспензію досліджуваних клітин: нагрів, опромінення УФ променями (за вибором).

2. Приготувати препарати «роздавлена крапля», як у завданні 1.

3. Провести спостереження люмінесценції клітин, як у завданні 1. Порівняти з результатами попередніх спостережень.

Завдання 3. Вивчення впливу іонів металу на електричний заряд клітин.

1. Приготувати препарати «роздавлена крапля», як у завданні 1, але, крім барвників і клітин, в обидва препарати додати по краплі розчину KCl.

2. Провести спостереження і відзначити характер люмінесценції клітин у присутності іонів металів. Пояснити результати спостережень.

Завдання 4. Зробити висновки.

Завдання 5. Розв'язати задачі.

1. Око людини сприймає світло з довжиною хвилі 500 нм у разі, коли світлові промені мають потужність, не меншу, ніж $20,8 \times 10^{-8}$ Дж/с. Яка кількість квантів світла при цьому потрапляє на сітківку ока кожної секунди?

2. Які мінімальні розміри клітини можна розглядати в світловому мікроскопі через синій світлофільтр 436 нм, якщо клітина перебуває в імерсійному середовищі з $n = 1,47$? (Прийняти апертурний кут об'єктива 80° .)

3. Фоторецепторні клітини сітківки – це біологічні трансдюсери, які перетворюють енергію квантів світла на електричну енергію рецепторного потенціалу. Експериментально встановлено, що достатньо 2 квантів світла ($\lambda = 500$ нм) для появи порогового відчуття. При дії квантів світла реєструється рецепторний потенціал у вигляді гіперполяризації мембрани, що супроводжується зміщенням у мембрані 10^5 елементарних зарядів. Величина мембранного потенціалу становить 40 мВ. Оцінити коефіцієнт підсилення «біологічного трансдюсера» при трансформації світлової енергії в електричну.

4. Один моль квантів ІЧ-світла з $\lambda = 1500$ нм поглинається 1 л води при 0°C . На скільки збільшиться температура води після поглинання ІЧ-світла? (Питома теплоємність води $c = 4,182 \text{ кДж} \cdot \text{кг}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$.)

5. Для розриву хімічного зв'язку у фотохімічній реакції необхідна енергія 430 кДж/моль. Світло з якою довжиною хвилі необхідно використати для цієї фотохімічної реакції?

Завдання 6. Виконати тестові завдання.

1. Флуоресценція – це випромінювальний перехід:

- a) $S_1 \rightarrow S_0$;
- b) $S_0 \rightarrow S_1$;
- c) $T_1 \rightarrow S_0$;
- d) $S_0 \rightarrow T_1$.

2. Яке з тверджень є правдивим:

- a) довжина хвилі збуджуючого світла завжди більше довжини хвилі люмінесценції;
- b) довжина хвилі люмінесценції завжди більше довжини хвилі збуджуючого світла;
- c) значення довжин хвиль люмінесценції та збудження можна порівняти?

3. Від чого залежить величина квантового виходу? Виберіть неправильні варіанти:

- a) природи речовини;
- b) об'єму досліджуваної речовини;
- c) розчинника та наявності домішок;
- d) рН і температури середовища.

4. Фосфоресценція – це випромінювальний перехід:

- a) $S_1 \rightarrow S_0$;
- b) $S_0 \rightarrow S_1$;
- c) $T_1 \rightarrow S_0$;
- d) $S_0 \rightarrow T_1$.

5. Здатність біологічних об'єктів до люмінесценції – це:

- a) природна люмінесценція;
- b) вторинна люмінесценція;
- c) фотолюмінесценція;
- d) хемілюмінесценція.

6. Вторинна люмінесценція біологічних об'єктів – це:

- a) природна люмінесценція біологічних об'єктів;
- b) люмінесценція біологічних об'єктів у присутності іонів металів;
- c) люмінесценція біологічних об'єктів у присутності флуорохромів;
- d) люмінесценція біологічних об'єктів у присутності барвників.

7. Квантовий вихід – це:

- a) випромінювальний перехід між збудженим і основним станом;
- b) випромінювальний перехід між основним і збудженим станом;
- c) відношення числа випромінених квантів до числа поглинутих квантів;
- d) відношення числа поглинутих квантів до числа випромінених квантів.

8. Чим зумовлена люмінесценція білкових молекул:

- a) присутністю барвників;
- b) наявністю аміногруп;
- c) наявністю природних флуорохромів (тирозин, триптофан, фенілаланін);
- d) складною структурою білкових молекул?

9. Ароматичні органічні сполуки, що здатні до флуоресценції:

- a) метаболіти;
- b) канцерогени;
- c) флуорохроми;
- d) мутагени.

10. Заряджені барвники взаємодіють з клітинами за допомогою:

- a) розчинення в ліпідній області бішару;
- b) утворення сполук типу солей;
- c) електроадсорбції;
- d) гідрофобних взаємодій з білковими молекулами.

11. Класифікація видів люмінесценції (електролюмінесценція, радіолюмінесценція, хемілюмінесценція, фотолюмінесценція) здійснюється з урахуванням:

- a) природи зовнішнього джерела енергії, що викликає збудження;
- b) хімічної природі флуорохромів;
- c) величини квантового виходу люмінесценції;
- d) часу життя збудженого стану флуорохрому.

12. У молекулі флуорохрому випромінювальний перехід можливий при переході:

- a) з основного стану в збуджений;
- b) зі збудженого стану в основний;
- c) з триплетного стану в синглетний;
- d) з синглетного стану в триплетний.

Контрольні питання

1. Які особливості спостереження об'єктів у люмінесцентний мікроскоп? Нарисуйте хід променів у люмінесцентному мікроскопі.

2. Способи освітлення об'єктів у люмінесцентному мікроскопі. Поділ світлових потоків збудження та люмінесценції.

3. Квантово-хімічне пояснення люмінесценції. Первинна і вторинна люмінесценція.

4. На енергетичній діаграмі вкажіть і поясніть відмінності між рівнями синглетного та триплетного станів.

5. Вкажіть на енергетичній діаграмі переходи, що відповідають флуоресценції, фосфоресценції.

6. Поясніть правило Стокса.

7. Що називається квантовим виходом люмінесценції? Вкажіть чинники, які впливають на квантовий вихід люмінесценції.

8. Вкажіть на переваги люмінесцентної мікроскопії в порівнянні з іншими видами мікроскопії.

9. Наведіть приклади первинної люмінесценції біомолекул. Як власна люмінесценція біооб'єктів використовується в біофізичних дослідженнях?

10. Чим зумовлена люмінесценція клітин рослинного і тваринного походження?

11. Дайте фізико-хімічні характеристики барвників, використаних у лабораторній роботі.

Рекомендована література

1. Костюк П. Г., Зима В. Л., Магура І. С., Мірошніченко М. С., Шуба М. Ф. Біофізика / за ред. П. Г. Костюка. Київ : Обереги, 2001. 544 с.

2. Антонюк В. С., Тимчик Г. С., Бондаренко Ю. Ю., Петльований П. В., Білокінь С. О., Бондаренко М. О. Методи та засоби мікроскопії. Київ : НТУУ «КПІ», 2013. 336 с.

3. Parson W. W. Modern Optical Spectroscopy With Exercises and Examples from Biophysics and Biochemistry. 2nd Edition. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2015. 588 p.

4. Demchenko A. P. Introduction to Fluorescence Sensing. 2nd Edition. Springer International Publishing, Switzerland. 2015. 818 p.

5. Lakowicz J. R. Principles of Fluorescence Spectroscopy. 3rd Edition. Springer Science+Business Media, LLC. 2006. 980 p.

6. Частина мікроскопа та їх функції. [Електронний ресурс]. Режим доступу : <https://microbiologynote.com/microbiology/microscope/>.

7. Флуоресцентна мікроскопія – визначення, принцип, частини, застосування, приклади. [Електронний ресурс]. Режим доступу : <https://microbiologynote.com/fluorescence-microscope-principle-instrumentation-applications-advantages-limitations-images/>.

Лабораторна робота № 4



ДОСЛІДЖЕННЯ ЗВ'ЯЗУВАННЯ ЛІГАНДІВ З КЛІТИННОЮ ПОВЕРХНЕЮ

Мета роботи: визначення параметрів зв'язування барвника з клітинами дріжджів за методом Клотца.

Підготовка до роботи. Повторити наступні питання:

1. Фізико-хімічні властивості барвника БТС. Особливості взаємодії барвника БТС з біологічними об'єктами.
2. Визначення параметрів зв'язування з мембраною за методами Клотца і Скетчарда.

В основі молекулярного механізму дії біологічно активних речовин, а саме ферментів, лікарських сполук, барвників, іонів металів, отрут, гормонів та інших, лежить їх зв'язування (або **адсорбція**) з деякою молекулярною або надмолекулярною структурою – **рецептором** (або **адсорбентом**) – R . Рецепторами є макромолекули клітини, молекулярні комплекси, субклітинні структури, самі клітини та їх агрегати. Адсорбція може бути представлена як процес утворення зв'язку між рецептором та біологічно активною речовиною **лігандом** (або **адсорбатом**) – L . Найчастіше молекулярна маса ліганда менше, ніж молекулярна маса рецептора.

Якщо поверхня рецептора може зв'язати тільки одну молекулу ліганда, то говорять про **одномісне зв'язування**, яке схематично представляється звичайною рівноважною зворотною хімічною реакцією з утворенням **комплексу** RL :



Швидкості реакцій асоціації V_{ass} та **дисоціації** V_{dis} комплексу RL визначаються співвідношеннями

$$V_{ass} = k_{ass}[R][L], \quad (2)$$

$$V_{dis} = k_{dis}[RL], \quad (3)$$

де $[R]$, $[L]$, $[RL]$ – концентрації рецептора, ліганду і комплексу ліганд–рецептор, відповідно; k_{ass} і k_{dis} – константи швидкостей прямої та зворотної реакцій. Розмірність k_{ass} – $M^{-1}xv^{-1}$, k_{dis} – xv^{-1} . За умов рівноваги $V_{ass} = V_{dis}$ і

$$k_{ass}[R][L] = k_{dis}[RL]. \quad (4)$$

Константа дисоціації комплексу визначається як відношення швидкостей зворотної і прямої реакцій:

$$K_{dis} = \frac{k_{dis}}{k_{ass}} = \frac{[R][L]}{[RL]}. \quad (5)$$

Величина константи дисоціації чисельно дорівнює концентрації ліганду, при якій концентрації вільного та зв'язаного рецептора рівні. Чим більше спорідненість рецептора до ліганду, тим менше константа дисоціації і, таким чином, тим менше концентрація ліганду, при якій половина молекул рецептора буде зв'язана з лігандом. Розмірність K_{dis} – [M]. Величина, обернена константі дисоціації, є **константою зв'язування** K_{ass} (або K_b):

$$K_{ass} = \frac{1}{K_{dis}} = \frac{k_{ass}}{k_{dis}} = \frac{[RL]}{[R][L]}. \quad (6)$$

Розмірність K_{ass} – [M⁻¹].

Фізичний сенс константи зв'язування полягає в тому, що розрахована для стандартних умов величина K визначає зміну вільної енергії при переході 1 моля ліганду в зв'язаний стан і таким чином можливість протікання процесу, а саме:

$$\Delta G^0 = -RT \ln K_{ass}, \quad (7)$$

де R – газова стала, T – абсолютна температура.

Для випадку, коли рецептор має не одне, а декілька місць зв'язування, говорять про **багатомісне зв'язування**. В такому разі важливою характеристикою взаємодії ліганду з рецептором є **число типів зв'язування** – i . Місця зв'язування можуть бути ідентичними (одного типу) і мати однакові значення параметрів зв'язування і характеристики зв'язаного ліганду – **однорідне зв'язування** або відрізнятися за параметрами зв'язування (n_i – **число місць** або **число центрів зв'язування** та K_i – **константи зв'язування**) та фізичними характеристиками зв'язаного ліганду – **неоднорідне (гетерогенне) зв'язування**.

У більшості випадків різні місця зв'язування характеризуються різними значеннями констант зв'язування. Наприклад, різні амінокислоти в білку мають неоднакову спорідненість до протонів. Крім того, число і структура центрів зв'язування може змінюватися під впливом різноманітних факторів.

Якщо зв'язування ліганду на одному місці не впливає на зв'язування ліганду на іншому, то рецептор характеризується **незалежними місцями зв'язування**. Такий характер має зв'язування лактатдегідрогенази з чотирма молекулами НАДФ. Прикладом одномісного зв'язування є зв'язування кисню з міоглобіном.

Якщо зв'язування ліганду на одному з місць сприяє зв'язуванню на інших так, що заповнення вільних місць зв'язування відбувається лавино-подібно, то говорять про **кооперативність** зв'язування або про взаємодію **з високим ступенем кооперативності**. Класичним прикладом кооперативного зв'язування слугує зв'язування кисню з гемоглобіном.

Використання рівняння зв'язування для дослідження механізмів ферментативних реакцій та транспорту речовин через мембрану за допомогою переносників зумовлено тим, що швидкість протікання ферментативних реакцій визначається ступенем насичення фермента субстратом, а швидкість транспорту речовин через мембрану – ступенем насичення переносника речовиною, що переноситься. До одного з методичних підходів у дослідженні структурно-функціональних характеристик мембрани та молекулярних механізмів дії біологічно активних сполук також відноситься визначення фізичних закономірностей ліганд-рецепторного зв'язування.

Для оцінювання характеристик зв'язування розроблено низку способів, які використовують різноманітні експериментальні методи визначення концентраційних змін фізичних характеристик ліганду та/або рецептора протягом реакції комплексоутворення (рівноважний діаліз; флуоресцентна, абсорбційна й інфрачервона спектрофотометрія; термічна денатурація; ЯМР- та ЕПР-спектроскопія та інші).

У разі **багатомісного однорідного зв'язування з незалежними місцями зв'язування** в стані рівноваги між вільними молекулами ліганду у водному розчині та лігандом, який зв'язаний рецепторами, залежність між концентрацією вільного – C_f , концентрацією зв'язаного – r ліганду та концентрацією центрів зв'язування на мембрані – N характеризується константою асоціації – K_{ass} :

$$K_{ass} = \frac{r}{C_f(N-r)}. \quad (8)$$

З огляду на рівняння (7) константа зв'язування тим більше, чим більше зміна вільної енергії ліганду при адсорбції на рецепторі.

Експериментально визначаються концентрації вільного – C_f та зв'язаного – r ліганду при різних співвідношеннях концентрацій ліганд/рецептор. Константу зв'язування – K_{ass} та кількість місць зв'язування – N можна визначити з графічних побудов залежності $1/r$ від $1/C_f$ – **метод Клотца** (рис. 1):

$$\frac{1}{r} = \frac{1}{N} + \frac{1}{K_{ass}N} \cdot \frac{1}{C_f} \quad (9)$$

або залежності r/C_f від r – **метод Скетчарда** (рис. 2):

$$\frac{r}{C_f} = K_{ass}n - K_{ass}r. \quad (10)$$

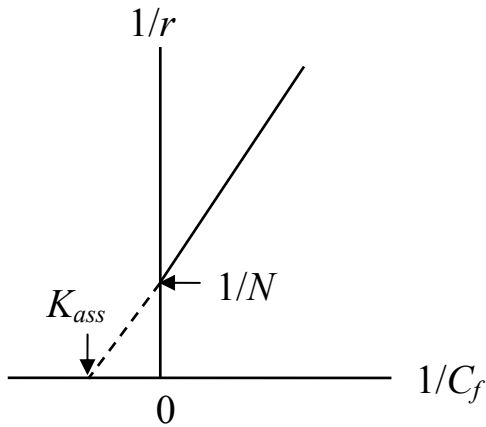


Рис. 1. Графік залежності Клотца

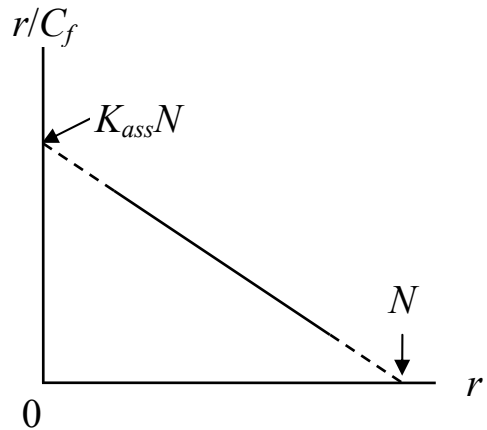


Рис. 2. Графік залежності Скетчарда

Ділянка прямої залежності Клотца (рис. 1), що містить експериментальні точки, показана суцільною лінією, пунктиром показана екстраполяція експериментальних точок до перетину з осями координат. Точки перетину з віссю ординат – $1/N$, з віссю абсцис – K_{ass} .

Екстрапольована аналогічним чином пряма залежності Скетчарда (рис. 2) перетинає вісь ординат у точці $K_{ass}N$, а вісь абсцис у точці N .

Для неоднорідного незалежного зв'язування, коли на рецепторі є два або більше місць зв'язування, то для кожного з них константа зв'язування – K_i , визначається за формулою:

$$K_i = \frac{r_i}{C_f(N_i - r_i)}, \quad (11)$$

де C_f – однакова для всіх i . Рівновага в цьому випадку визначається набором $2i$ параметрів. У координатах Клотца по ординаті відкладається $1/\sum_i r_i$ та відсікається відрізок $1/\sum_i N_i$. На осі абсцис відсікається усереднена складним чином по всіх i величина K_i . Експериментальна залежність має лінійний характер. Зробити висновок про кількість типів зв'язування неможливо. Якщо побудувати ці дані в координатах Скетчарда, то отримаємо викривлені залежності.

Кооперативне зв'язування можна уявити як одностадійну реакцію типу:



з константою зв'язування:

$$K_{ass} = \frac{[RL_m]}{[R][L]^m}. \quad (13)$$

У цьому випадку в координатах Скетчарда криві будуть опуклими при позитивній кооперативності (K_{ass} зростає з ростом r) та увігнутими

при негативній кооперативності (антикооперативності) (K_{ass} зменшується з ростом r), рівняння зв'язування має наступний вигляд:

$$K_{ass} = \frac{r}{C_f^m (N-r)}. \quad (14)$$

У логарифмічному вигляді:

$$\ln \frac{r}{N-r} = \ln K_{ass} + m \ln [C_f]. \quad (15)$$

Таким чином, графік залежності $\frac{r}{N-r}$ від $[C_f]$, побудований у логарифмічному масштабі, являє собою пряму з кутом нахилу, рівним m . Таке представлення даних, відоме під назвою **залежність Хілла**, для одномісного зв'язування дає лінійну залежність, тангенс кута нахилу якої дорівнює одиниці, а величина m називається **коефіцієнтом Хілла** та **характеризує ступінь кооперативності**.

На практиці в координатах Скетчарда доволі складно відрізнити гетерогенне зв'язування від антикооперативного. Таким чином відхилення залежності Скетчарда від лінійного закону є критерієм неоднорідності ділянок зв'язування та/або свідчить про наявність двох або більше типів зв'язування та кооперативності зв'язування. В координатах Клотца за умов гетерогенного зв'язування отримаємо лінійну залежність, при кооперативному – викривлену лінію. Тому **доцільно використовувати обидва методи**, оскільки в разі **неоднорідності** місць зв'язування, **кооперативності** та **конкурентного** зв'язування визначення параметрів K_{ass} і N ускладнюється.

Засоби аналізу конкурентного зв'язування двох або більше лігандів з рецептором дають складні громіздкі рівняння, які, як правило, спрощуються в кожному конкретному випадку.

Для розрахунку K_{ass} і N визначають концентрації зв'язаного – r або вільного – C_f ліганду або рецептора (в залежності від умов експерименту), припускаючи пряму пропорційність між концентрацією зв'язаного рецептора та змінами фізичних характеристик, що реєструються під час титрування відомої концентрації рецептора змінними концентраціями ліганду (або навпаки) в широкому інтервалі значень, досягаючи насичення місць зв'язування ліганду на рецепторі. Після аналізу цих залежностей та математичних перетворень рівняння зв'язування (8) з урахуванням припущень $N \gg r$ (концентрація рецептора значно перебільшує концентрацію ліганду) та/або $C_0 \gg r$ (умови надлишку ліганду) будують графіки Клотца або Скетчарда та визначають K_{ass} і N . Один з прикладів такого аналізу наведено в роботі [4].

В лабораторній роботі з метою виявлення особливостей зв'язування ліганду з клітинною поверхнею використовується метод абсорбційної спектрофотометрії.

Основним законом абсорбційної спектрофотометрії є закон Бугера–Ламберта–Бера:

$$I = I_0 \cdot e^{-kCl} = I_0 \cdot 10^{-\varepsilon Cl}, \quad (16)$$

де I та I_0 – інтенсивність монохроматичного світлового потоку, що пройшов через зразок, та інтенсивність падаючого світлового потоку;

l – товщина поглинаючого шару, C – концентрація поглинаючої речовини:

k – ефективна площа поперечного перерізу молекули, яка поглинає кванти світла;

ε – молярний коефіцієнт екстинкції.

Величини k і ε ($k = 2,303 \cdot \varepsilon$) є індивідуальною властивістю речовини і характеризують здатність молекул даної речовини до поглинання світла певної довжини хвилі, тобто залежать від довжини хвилі падаючого світла, природи розчиненої речовини, температури розчину та не залежать від умов вимірювання.

Закон Бугера–Ламберта–Бера в логарифмічній формі записується так:

$$D = \varepsilon Cl, \quad (17)$$

де D – оптична щільність.

Для спектрофотометричної оцінки здатності речовини до поглинання використовують величину оптичної щільності D , яка прямо пропорційна концентрації поглинаючої речовини C .

Оптичні властивості барвника бромтимолового синього дозволяють ефективно використовувати його в дослідженнях ліганд-рецепторної взаємодії (рис. 3).

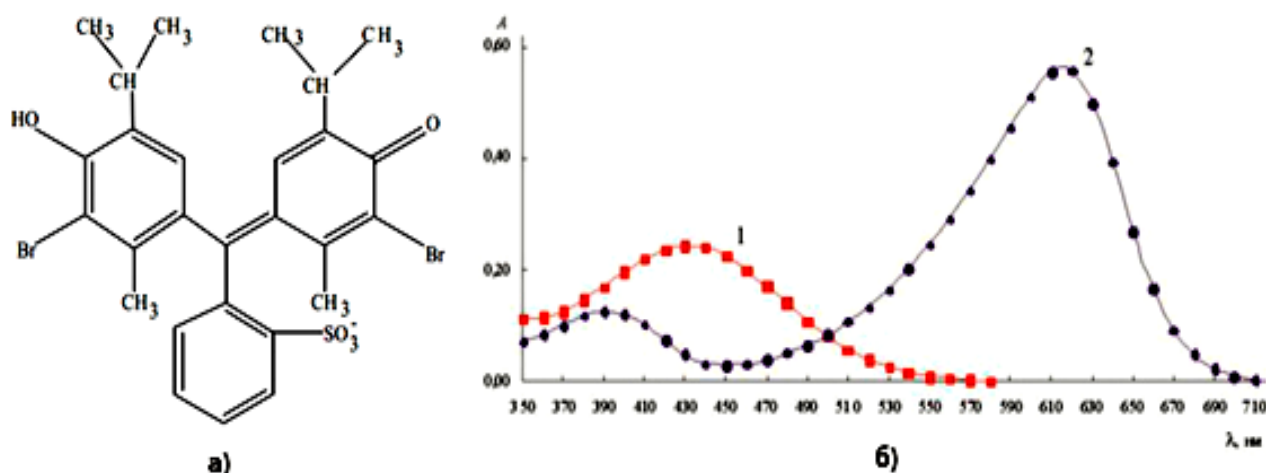


Рис. 3. а) Структурна формула БТС; б) Спектр поглинання БТС при різних значеннях рН (лінія 1 – рН=3,2; лінія 2 – рН=7,6)

БТС чутливий до зміни мікрооточення (має дві форми, характерні для кислого та лужного значення рН мікрооточення) та активно взаємодіє з біологічними мембранами. Барвник ефективно поглинає на довжині хвилі 615 нм та має молярний коефіцієнт екстинкції $\varepsilon = 2,25 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ для його лужної форми. Наявність від'ємного заряду в молекулі БТС визначає чутливість барвника до електрохімічних властивостей клітинної поверхні.

Встановлено, що при зв'язуванні з інтегральними мембранними білками молекула БТС локалізується на межі полярної та неполярної областей мембрани. При цьому полярна частина молекули барвника розташовується біля позитивно зарядженої групи білка, а неполярна частина експонується в гідрофобну ліпідну частину. Таким чином, величина зв'язування визначається як спорідненістю ліганду до центра зв'язування, так і електрохімічними властивостями мембрани (розташуванням зарядів та поверхневим потенціалом, від якого залежить концентрація ліганду в примембранному шарі).

Виконання роботи

Лабораторне обладнання та матеріали: спектрофотометр, центрифуга, мікроскоп, камера Горяєва, пробірки, предметні і покривні скла, скляні палички, дозаторні піпетки, клітинна суспензія (дріжджі), фільтрувальний папір, 0,1 мМ розчин барвника бромтімолового синього (БТС), 0,9 % розчин NaCl, 5 мМ трис-HCl буфер.

Завдання 1. Побудувати градувальну залежність.

1. Приготувати ряд послідовних розведень вихідного розчину 0,1 мМ бромтімолового синього в 5мМ розчині трис HCl буфера (в інтервалі концентрацій 1,6–16 мкМ), загальний об'єм кожного зразка становить 3 мл.

2. Підготувати до роботи спектрофотометр СФ-18 згідно з інструкцією. Вимірювання здійснювати на довжині хвилі 615 нм.

3. Вимірювання оптичної густини – D_0 розчинів здійснювати в порядку зростання загальної концентрації БТС – C_0 .

4. Внести дані в таблицю та побудувати градувальну криву $D_0 = f(C_0)$.

D_0										
C_0										

Завдання 2. Приготувати відмиту суспензію клітин дріжджів.

1. Приготувати 1 % розчин суспензії клітин сухих дріжджів.

2. Приготувати робочий розчин суспензії клітин шляхом трикратного відмивання клітин у фізіологічному розчині за умов центрифугування 1500 об/хв протягом 10 хв. Відмиті клітини суспендувати в 8 мл розчину 5мМ трис HCl буфера.

3. Визначити концентрацію клітин в одиниці об'єму за допомогою камери Горяєва. Розрахувати об'єм аліквоти суспензії клітин, при додаванні якої в об'єм 3 мл 5мМ трис НС1 буфера рН 7,4 концентрація клітин становитиме $1800 \cdot 10^4$.

Завдання 3. Визначити константу зв'язування K_{ass} та число центрів зв'язування N при взаємодії бромтимолового синього з клітинами дріжджів.

1. Підготувати для дослідження ряд послідовних розведень 0,1 мМ бромтимолового синього в 5мМ розчині трис НС1 буфера (в інтервалі концентрацій 1,6–16 мкМ), загальний об'єм кожного зразка становить 3 мл. У кожний зразок додати аліквоту відмитих клітин, кінцева концентрація клітин у кожній пробі становить $1800 \cdot 10^4$ клітин.

2. Поставити приготовані зразки на інкубацію протягом 30 хвилин при заданій температурі (наприклад, 27 °С).

3. Після інкубації провести центрифугування зразків протягом 10 хв при 1500 об/хв. При цьому частина барвника, зв'язаного клітинами, виявиться в осаді, а інша частина барвника, незв'язаного з клітинами – вільна, буде знаходитися в розчиненому стані в надосадовій рідині.

4. Надосадову рідину акуратно, не торкаючись осаду, відібрати в попередньо пронумеровані чисті пробірки. Виміряти оптичну густину D_f кожного зразка.

5. Визначити значення концентрації вільного барвника за розрахунковою формулою $C_f = \frac{C_0 \cdot D_f}{D_0}$ та за даними градуувальної залежності.

Зменшення концентрації вільного C_f барвника в порівнянні з початковою концентрацією C_0 пов'язано зі зв'язуванням його поверхнею клітин.

6. Визначити значення концентрації зв'язаного r барвника за розрахунковою формулою $r = C_0 - C_f$.

7. Внести отримані величини в таблицю.

r										
C_f										

8. Побудувати графік залежності $1/r$ від $1/C_f$ (координати Клотца) і визначити константу зв'язування K_{ass} та число місць зв'язування N .

9. Побудувати ізотерму зв'язування r/C_f від r (координати Скетчарда) і визначити константу зв'язування K_{ass} та число місць зв'язування N . Порівняти з даними, отриманими за методом Клотца.

Завдання 4. Зробити висновки.

Завдання 5. Розв'язати задачі.

1. На початку епідемії грипу пацієнт був щеплений за допомогою вакцини. В результаті в його крові з'явилися антитіла проти антигенів вірусу грипу. Концентрація антитіл склала 10^{-12} М, константа зв'язування антитіла з антигеном дорівнює 10^{11} М⁻¹. Розрахувати, якою мірою вдасться блокувати антигени вірусу антитілами при інфікуванні, якщо концентрація антигенів у крові склала 10^{-18} М.

2. Бичачий сироватковий альбумін (БСА) має одну ділянку зв'язування триптофану з константою зв'язування $K=2 \times 10^5$ М⁻¹. При якій концентрації триптофану буде заповнено 50 % ділянок зв'язування в 10^{-5} М розчині БСА.

3. За допомогою колонкової хроматографії вивчають зв'язування тирозину з сироватковим альбуміном людини, загальна концентрація якого становила 5 мкмоль/л. Нижче наведено концентрації тирозину [L], внесеного в суміш і зв'язаного з білком [P] при температурах 27 і 37 °С. Навести отримані результати в координатах Скетчарда. Знайти константу зв'язування K і кількість центрів зв'язування n. Розрахувати термодинамічні параметри зв'язування (ΔG^0 , ΔH^0 і ΔS^0) тирозину з сироватковим альбуміном людини.

Зв'язування тирозину з сироватковим альбуміном людини		
[L], мкмоль/л	[P], мкмоль/л	
	27 °С	37 °С
320	3,4	2,4
640	4,0	3,2
1200	4,4	3,5
1640	4,6	4,0

4. Визначити за методом Скетчарда величини констант зв'язування та кількість місць зв'язування трипсину з іонами Mn^{2+} у водних розчинах з відомими співвідношеннями білка та іонів за даними методу ЕПР у припущенні існування двох типів зв'язування.

$\frac{[Mn^{2+}]_{зв'яз.}}{[Трипсин]_{загальн.} [Mn^{2+}]_{вільн.}}$	2950	2100	1500	700	450	250
$\frac{[Mn^{2+}]_{зв'яз.}}{[Трипсин]_{загальн.}}$	0,3	0,5	1,0	2,6	3,6	7,0

Завдання 6. Виконати тестові завдання.

1. Основний закон абсорбційної спектрофотометрії:

а) $I = I_0 \cdot e^{-kCl}$; б) $I - I_0 = e^{-kCl}$; с) $I = I_0 \cdot 10^{\varepsilon Cl}$.

2. Визначення молярного коефіцієнта екстинкції:

а) характеризує здатність молекул речовини до поглинання світла певної довжини хвилі, залежить від довжини хвилі падаючого світла, природи речовини, температури розчину;

б) характеризує здатність молекул речовини до переломлення світла певної довжини хвилі, залежить від довжини хвилі падаючого світла, природи речовини, температури розчину;

с) характеризує здатність молекул речовини до поглинання світла певної довжини хвилі, залежить від довжини хвилі падаючого світла, не залежить від природи речовини та температури розчину.

3. Характерні сили ліганд-рецепторної взаємодії:

а) електростатичні;

б) гідрофобні;

с) іонні.

4. Фізичний зміст константи зв'язування K :

а) величина K визначає зміну вільної енергії при переході 10 молей ліганду з вільного стану у зв'язаний;

б) величина K визначає зміну вільної енергії при переході 1 моля ліганду зі зв'язаного стану у вільний;

с) величина K визначає зміну вільної енергії при переході 1 моля ліганду з вільного стану у зв'язаний.

5. Визначення кооперативності ліганд-рецепторної взаємодії:

а) зв'язування ліганду на одному з місць стимулює лавиноподібне заповнення вільних місць зв'язування;

б) зв'язування ліганду на одному з місць пригнічує заповнення вільних місць зв'язування;

с) кооперативність – процес, не характерний для ліганд-рецепторної взаємодії.

6. Фізичний зміст коефіцієнта Хілла:

а) характеризує ступінь кооперативності;

б) характеризує ступінь гомогенності ліганд-рецепторних комплексів;

с) характеризує силу ліганд-рецепторної взаємодії.

7. Аналіз взаємодії ліганд – рецептор на поверхні клітини методами Клотца та Скетчарда допомагає визначити:

а) заряд клітин;

б) константу зв'язування та термодинамічні параметри;

с) внутрішньоклітинний рН;

д) концентрацію рецепторів та барвника.

8. Як виглядає графік, який отримують для аналізу зв'язування за методом Клотца:

- a) залежність поглинання від часу;
- b) залежність концентрації від температури;
- c) кореляція обернених концентрацій;
- d) залежність тиску від об'єму?

9. Який із наведених нижче термодинамічних параметрів зазвичай НЕ визначається за допомогою методів Клотца та Скетчарда при вивченні ліганд-рецепторного зв'язування:

- a) ентальпія;
- b) ентропія;
- c) внутрішня енергія;
- d) вільна енергія Гіббса?

10. Які термодинамічні параметри адсорбції можна визначити за допомогою методу Клотца:

- a) ентропія та тиск;
- b) ентальпія та концентрація;
- c) стала рівноваги та вільна енергія;
- d) робота та час?

11. Які фізичні процеси відбуваються під час взаємодії барвника з поверхнею клітин:

- a) іонізація та розпад;
- b) осмос та дифузія;
- c) комплексоутворення та дисоціація;
- d) термічна експансія та конвекція?

12. Які фактори можуть впливати на точність результатів методу Клотца:

- a) температурні зміни та присутність інгібіторів;
- b) колір барвника;
- c) розмір клітин та кількість використаних барвників;
- d) спектральна чутливість фотометра?

13. Яка основна мета визначення константи зв'язування у взаємодії ліганд-клітина:

- a) виміряти концентрацію лігандів;
- b) зрозуміти кінетику зв'язування;
- c) визначити розмір клітин;
- d) визначити колір ліганду?

14. Що дозволяє визначити знайдена константа зв'язування (K_{ass}) при вивченні взаємодії ліганд-рецептор:

- a) швидкість дифузії ліганду;
- b) константу дисоціації;
- c) загальну концентрацію ліганду;
- d) кількість рецепторів на поверхні клітини?

15. Як збільшення константи зв'язування впливає на спорідненість зв'язування ліганду з поверхнею клітини:

- а) підвищує спорідненість;
- б) зменшує спорідненість;
- с) не впливає на афінність;
- д) перетворює афінність у звідність?

Контрольні запитання

1. Для яких цілей може бути використаний метод зв'язування?
2. Основні види зв'язування і характеристики зв'язування.
3. Який фізичний зміст константи зв'язування і як вона визначається?
4. Що являють собою криві Клотца та Скетчарда і яку інформацію можна отримати з їх аналізу?
5. Чому відрізняються кути нахилу графіків Клотца та Скетчарда?
6. Запишіть рівняння Клотца та Скетчарда з урахуванням припущень $N \gg r$ (концентрація рецептора значно перебільшує концентрацію ліганду) та/або $C_0 \gg r$ (умови надлишку ліганду).
7. Для чого виконують екстраполяцію експериментальних даних при побудові графіків у координатах Клотца та Скетчарда?
8. Що розуміють під кооперативністю зв'язування?
9. Яким чином проявляється гетерогенність і кооперативність зв'язування на кривих Клотца та Скетчарда?

Рекомендована література

1. Костюк П. Г., Зима В. Л., Магура І. С., Мірошніченко М. С., Шуба М. Ф. Біофізика / за ред. П. Г. Костюка. Київ : Обереги, 2001. 544 с.
2. Cantor C., Schimmel P. R. Biophysical chemistry. Part III: The Behavior of Biological Macromolecules. W. H. Freeman and Company, San Francisco. 1980. 522 p.
3. Marshall A. G. Biophysical chemistry: Principles, techniques and applications. John Wiley & Sons, New York, 1978. 812 p.
4. Gorbenko G. P. Bromothymol blue as a probe for structural changes of model membranes induced by hemoglobin. Biochimica et Biophysica Acta. 1998. Vol. 1370. P. 107–118.

Лабораторна робота № 5



НАНОБІОФІЗИКА. СТВОРЕННЯ ЛІПОСОМ ТА ВИЗНАЧЕННЯ ЇХ РОЗМІРУ

Мета роботи: формування ліпосом та визначення їх розміру.

Підготовка до роботи. Повторити наступні питання:

1. Склад та функціональна організація молекулярних компонентів біологічних мембран.
2. Фізичні основи абсорбційної спектроскопії.
3. Розсіювання світла кулькоподібними частинками. Співвідношення Ангстрема. Рівняння Релея.

Багато об'єктів, які вивчає біофізика, мають розміри, близькі до розмірів нанотехнологічних об'єктів – малорозмірних структур від 1 до 100 нм хоча би в одному напрямку, та характеризуються якісно новими структурними і функціональними властивостями. Це, наприклад, клітини живих організмів, надмолекулярні біологічні структури – мембрани та їх штучні моделі – ліпосоми, а також окремі типи біомакромолекул – білки, нуклеїнові кислоти. *Нанобіофізика* вивчає закономірності фізико-хімічних процесів у біологічних нанорозмірних об'єктах з метою управління окремими атомами, молекулами, молекулярними системами. Результати цих досліджень відкривають широкі перспективи у створенні нових біологічних молекул, наноструктур, нанопристроїв та матеріалів зі спеціальними фізичними, хімічними та біологічними властивостями.

Наноматеріали умовно можна поділити на три основні класи: *полімери, молекулярні ансамблі та поодинокі молекули* – «розумні» або «функціональні» молекули.

Важливими структурами молекулярного рівня організації живих систем є *молекули біологічних полімерів* – білки, нуклеїнові кислоти, полісахариди, ліпіди, що утворені в основному *ковалентними зв'язками* та мають унікальні властивості самоорганізації/самозбірки та молекулярного впізнавання біологічних макромолекул – здатність формувати більші за розміром надмолекулярні біологічні структури (*нанокомплекси*).

Молекулярні ансамблі (кластери) – субмолекулярні структури, утворені за рахунок *невалентних міжмолекулярних взаємодій* (Ван-дер-Ваальсових сил, електростатичних сил, водневих зв'язків) шляхом *асоціації* декількох компонентів – рецептора та його субстрата (субстратів) – за принципами молекулярного *розпізнавання*. *Самоорганізація/самозбірка* – центральний процес усіх біологічних систем, який занований на

геометричній комплементарності та хімічному впізнаванні. Суттєву роль у природі відіграє принцип незворотності. Молекулярне впізнавання описує здатність молекул до взаємодії одна з одною з високою афінністю та специфічністю. Афінність – кількісна термодинамічна характеристика сили взаємодії молекул – константа дисоціації. Специфічним вважається зв'язування, якщо значення K_d нижче 1 мкМ. Наприклад, для реакції «антиген–антитіло» $K_d = 10^{-9} \div 10^{-12}$ М, для взаємодії «ліганд–рецептор» $K_d = 10^{-6} \div 10^{-10}$ М.

Структурно-функціональні закономірності надмолекулярної організації – ключ до розуміння багатьох клітинних процесів, наприклад фотоелектричних та транспортних. Чутливість та вибірковість таких систем до дії зовнішніх чинників (світло, атмосфера, вібрація, іонізуюче випромінювання) дозволяє використовувати їх у різноманітних сенсорах. Одним зі стратегічних напрямків у конструюванні наноматеріалів та наноприладів є використання принципів самозбірки і молекулярного впізнавання біологічних макромолекул.

До молекулярних ансамблів відносяться макромолекулярні ланцюжні структури нуклеїнових кислот та білків; гіллясті структури полісахаридів; регуляторні молекулярні комплекси гормонів, ферментів, медіаторів; рибосоми; віруси; міцелярні агрегати ліпідів; агрегати порфіринів; комплекси біомакромолекул з біологічно активними речовинами тощо. Важливу групу складають також моношари, що самоорганізуються, на основі біологічних молекул або полімерів.

Утворення, функціонування та розпад подібних нанобіокомплексів представляє більш високий – надмолекулярний, або субклітинний рівень організації живих систем. Особливе місце в ньому займають біологічні мембрани.

Мембрани різних органел мають неоднаковий ліпідний і білковий склад, що пов'язано з їх функціями. Так, мембрани мітохондрій тонкі (близько 5 нм) і мають глобулярну структуру білків та специфічний набір фосфоліпідів. Мембрани комплексу Гольджі досить товсті (6–9 нм), містять інші білки і ліпідні молекули. У цитоплазматичних мембранах знаходяться молекули-рецептори до біологічно активних сполук, наприклад, гормонів. Кожний різновид мембран містить близько 50 % білків. Мембрани мають також значний відсоток вуглеводів. Наприклад, мембрана еритроцитів складається приблизно з 40 % ліпідів, 50 % білків, 2-10 % вуглеводів. Зв'язана вода складає 30 % усієї маси мембрани. В деяких мембранах знаходяться сліди РНК – до 0,1 %. Відносні кількості ліпідів і білків значно варіюють: наприклад, у мієліновій мембрані ліпіди складають 75 % і 25 % – білки, а у внутрішній мембрані мітохондрій на частку ліпідів припадає 25 % і 75 % складають білки.

Незважаючи на різні функції, всі біологічні мембрани мають один і той же загальний основний склад: подвійний ліпідний бішар і асоційовані з ним білки.

Мембранні білки відповідають за всі спеціалізовані види біологічної активності, наприклад, каталізують процес зварювання мембран. Білки не утворюють шари, а розташовані нерівномірно у вигляді мозаїки з глобул; при цьому одні з них знаходяться тільки на поверхні, інші занурені в ліпідну фазу частково або повністю, іноді пронизують її наскрізь.

Ліпідний бішар являє собою рідину, в якій окремі молекули ліпідів дифундують у межах свого моношару та іноді переміщаються між шарами. Динамічна структура біологічної мембрани (її в'язкість і рухливість) залежить від ліпідного складу бішару і температури.

У складі клітинних мембран присутні ліпіди трьох класів: фосфоліпіди, гліколіпіди та стерини. Оскільки фосфоліпіди складають основну частину ліпідного компонента мембран (80 %), значну увагу дослідників привертають штучні фосфоліпідні мембрани.

Відомо, що *фосфоліпіди є амфіфільними сполуками*, їх молекули складаються з двох частин – гідрофільної полярної головки, спорідненої до води, та гідрофобних неполярних вуглеводневих ланцюгів, які мають водовідштовхувальний характер. Завдяки цій властивості фосфоліпідні молекули у водному середовищі формують бішар: гідрофобні ланцюги звернені один до одного і утворюють внутрішню неполярну область мембрани, а полярні головки знаходяться на поверхні мембрани і екранують вуглеводневі ланцюги від контакту з водою. Щоб повністю виключити контакт ланцюгів з водою, плоский бішар замикається сам на себе, утворюючи порожні оболонкові структури, які називають *везикулами* (від англ. *vesicle* – маленька бульбашка).

При механічному диспергуванні суспензії набряклих фосфоліпідів у воді утворюються *багатошарові частинки* або *мультиламелярні везикули (МЛВ)*, які називали *ліпосомами* (рис. 1). МЛВ складаються з декількох десятків, а навіть й сотень ліпідних бішарів, розділених водними проміжками, та мають розмір від 0,3-0,4 мкм до 50 мкм. Внут-

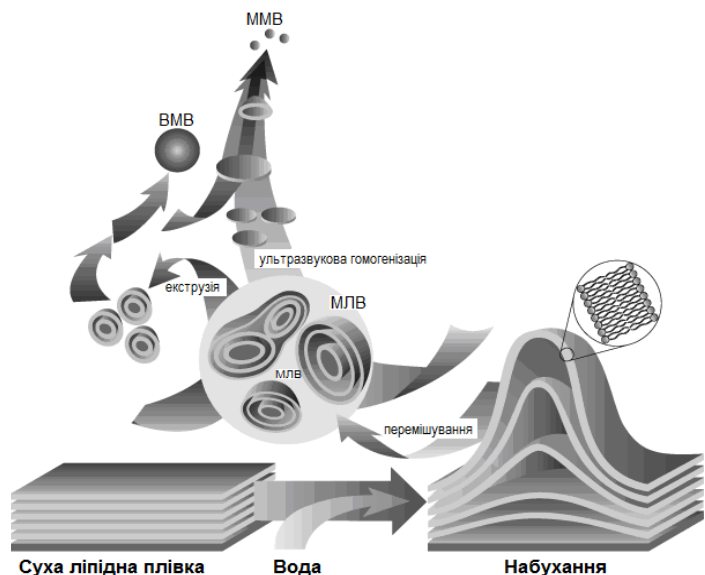


Рис. 1. Механізми утворення ліпосом [2].

МЛВ – мультиламелярні везикули,
ММВ – малі моношарові везикули,
ВМВ – великі моношарові везикули

рішній водневий об'єм ліпосом ізольований від зовнішнього середовища, що дає можливість вивчення бар'єрних властивостей ліпідного бішару.

Ліпосоми використовуються для інкапсулювання біологічно активних речовин: фармацевтичних препаратів, включаючи вакцини, косметологічних засобів, а також сполук-зондів для вирішування дослідницьких задач.

МЛВ власне не є наночастинками, але оскільки товщина ліпідного бішару менше 10 нм, ліпосоми можна визначити як мікрочастинки з наноструктурованою поверхнею.

Найменші частинки – *малі моноламельарні везикули* (ММВ) мають розмір від 15 до 50 нм і утворюються одним ліпідним бішаром.

Ліпіди можуть утворювати структури різноманітної форми (сферичні, плоскі дископодібні – дискосоми, тонкі довгі трубки – тубулярні ліпосоми), які відрізняються за розміром, кількістю ліпідних бішарів, складовими внутрішньої порожнини.

Форма і властивості ліпосом залежать від складу ліпідів (нейтральні, катіонні, аніонні типи ліпідів або їх композиції) та зовнішнього середовища.

Для отримання всіх видів ліпідних везикул не залежно від їх складу використовуються загальні елементи методів приготування: отримання ліпідної плівки, її гідратація та формування гомогенних за розміром везикул.

Для приготування ліпосом ліпіди перш за все повинні бути розчинені та перемішані в органічному розчиннику до утворення однорідної суміші: повного перемішування ліпідів до прозорого розчину. Зазвичай для цього використовують хлороформ (або суміш хлороформ : метанол, або трет-бутанол, або циклогексан) з концентрацією ліпідної компоненти 10–20 мг на 1 мл органічного розчинника. Більш високі концентрації ліпідів можливі, якщо їх розчинність та змішування є прийнятними. Після ретельного змішування ліпідів органічний розчинник видаляють і отримують ліпідну плівку. Для невеликих об'ємів розчину (<1 мл) розчинник можна видалити продуванням потоку сухого азоту чи аргону у витяжній шафі. Для великих об'ємів органічний розчинник видаляється випарюванням на роторному випарнику та на бокових сторонах випарної колби утворюється тонка ліпідна плівка. Для видалення залишків органічного розчинника цю плівку ретельно висушують, підключивши колбу до вакуумного насоса.

На другому етапі отримані тонкі ліпідні плівки або ліпідні шари гідратуються. Гідратують суху ліпідну плівку додаванням водного буферного розчину та ретельним перемішуванням. Температура водного середовища повинна бути вище температури переходу «гель–рідкий кристал» для ліпіда з найвищою температурою кристалізації T_c , який додається в суху ліпідну суміш. Після додавання гідратуючого середовища ліпідна суспензія повинна підтримуватися при температурі вище T_c протягом часу гідратації. Стопки рідкокристалічних шарів стають рідкими і набухають,

гідратовані ліпідні шари відокремлюються один від одного при перемішуванні та замикаються самі на себе, щоб уникнути взаємодії води з вуглеводневим ядром бішару по краях. Таким чином формуються великі, мультиламелярні везикули – МЛВ.

На третьому етапі після утворення МЛВ отримують ліпосоми визначеного розміру та форми. Для зменшення розміру частинок використовують ультразвукове опромінення (*ультразвукова гомогенізація, озвучування або соніфікація*) або багаторазово механічно продавлюють суспензію МЛВ крізь фільтри обраного розміру пор (*екструзія*).

Ультразвуковою обробкою протягом 5-10 хвилин при температурі вище T_c ліпіда зазвичай отримують *малі моношарові везикули* (ММВ) діаметрами від 15 нм до 50 нм. Якщо в ліпідній суспензії спостерігається мутність (тобто розсіювання світла викликають остаточні великі частинки), то кінцевий прозорий розчин отримують центрифугуванням суспензії. Середній розмір отриманих ММВ залежить від складу і концентрації ліпідів, температури, об'єму суспензії, потужності та часу обробки ультразвуком. Оскільки дуже складно відтворити умови обробки ультразвуком, то середній розмір ММВ, отриманих у різний час, значно відрізняється. Крім того, високий ступінь кривизни мембран зумовлює нестабільність ММВ та їх здатність повільно зливатися в більші везикули під час зберігання нижче температури фазового переходу.

Ліпідна екструзія – це метод, у якому ліпідну суспензію продавлюють крізь полікарбонатний фільтр з визначеним розміром пор, завдяки чому отримують везикули діаметром, близьким до розміру пор. Отримання *великих моношарових везикул* (ВМВ) можливе тільки з використанням фільтрів з розміром пор до 200 нм, оскільки при розмірі пор більше 200 нм утворюється полідисперсна суспензія мультишарових ліпосом.

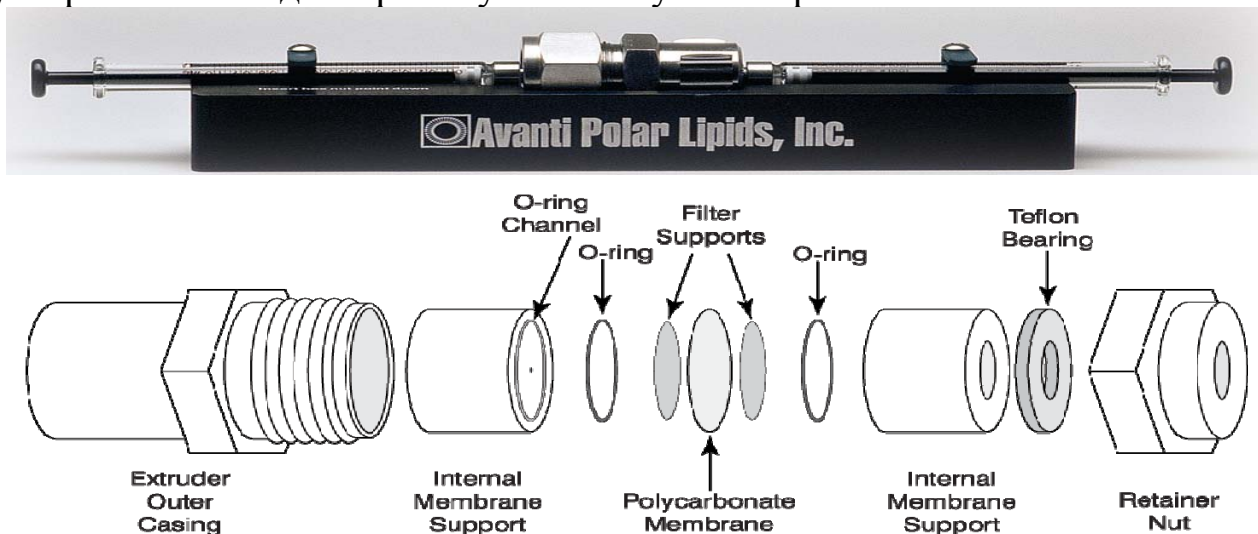


Рис. 2. Фотографія і схема екструдера для отримання ліпосом виробництва Avanti Polar Lipids, Inc. [<https://avantilipids.com/products/equipment/category/mini-extruder>]

Це допомагає запобігти обростанню мембран та поліпшити однорідність розподілення за розмірами кінцевої суспензії. Зауважимо, що всі процедури проводяться при температурі вище за T_c . Екструзія крізь фільтри з порами 100 нм зазвичай дозволяє отримати великі моншарові везикули з середнім діаметром 120-140 нм. Середній розмір везикул також залежить від ліпідного складу та добре відтворюється.

Детальну інформацію щодо виготовлення різноманітних форм ліпосом, їх властивостей, збереження тощо можна отримати на сайті <https://avantilipids.com/tech-support/liposome-preparation>.

Залежно від способу формування отримують ліпосоми різного розміру і характеристик. Розмір ліпосом важливий з точки зору їх застосування. У деяких випадках потрібні великі ліпосоми, наприклад, коли інкапсулюються частинки, що включають мікроорганізми, такі як бактерії, для отримання, наприклад, вакцин. Методики інкапсулювання варіюють залежно від природи реагенту і розміру та властивостей утворених ліпосом.

Однак у багатьох випадках кращі дрібні ліпосоми. Це пов'язано з тим, що дрібні ліпосоми не так швидко видаляються ретикуло-ендотеліальною системою (РЕС) і в меншій мірі, ніж великі ліпосоми (з розмірами понад 200 нм). Захоплення везикул в РЕС зростає зі збільшенням їх розміру. Крім того, великі ліпосоми при їх внутрішньом'язовій ін'єкції не здатні ефективно досягти регіонарних лімфатичних вузлів і доставити в них лікарські засоби.

Ліпосомні препарати, що містять різні лікарські засоби, можуть бути оптимізовані з точки зору змісту лікарського інгредієнта, стабільності, картини біологічного розподілу і рівня надходження в клітину шляхом зміни фізико-хімічних властивостей ліпосом, таких як: температура фазового переходу; розмір ліпосом; характер розподілу препарату за розміром; величина поверхневого заряду; гідратація поверхні сполуками, що несуть гідрофільні групи; характер розподілу за розміром везикул.

Виконання роботи

Необхідне обладнання та матеріали: розчин фосфатидилхоліну (лецитину) в C_2H_5OH 100 мг/мл; 5 мМ Na-фосфатний буфер, рН 7,4; магнітна мішалка; шприц; мішечок для діалізу з нитками; міні-екструдер виробництва Avanti Polar Lipids, Inc. (рис. 2); мірна склянка; колби; пробірки; автоматичні піпетки; кювети; спектрофотометр; фільтрувальний папір.

Завдання 1. Отримання ліпосом методом інжекції.

1. Приготування 5 мМ Na-фосфатного буфера рН 7,4: розчинити 2,384 г Na_2HPO_4 у 100 мл дистильованої води – розчин R_1 , розчинити 1,04 г $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ у 100 мл дистильованої води – розчин R_2 , змішати в колбі 75 мл розчину R_1 та 25 мл розчину R_2 , довести об'єм до 1 л. Проконтролювати значення рН на рН-метрі.

2. Налити у склянку 13 мл Na-фосфатного буфера з рН 7,4. Помістити склянку на магнітну мішалку, додавши маленький (~1 см) перемішувач, відрегулювати швидкість перемішування, щоб у розчині утворилася маленька воронка.

3. За допомогою шприца на 1 мл набрати 0,2 мл розчину фосфатидилхоліну (молекулярна маса – 775) в етанолі 100 мг/мл та з максимальною швидкістю вприснути в центр воронки у склянці з буфером.

4. Залишити суспензію на 5 хв. для перемішування.

5. Після перемішування суспензію перенести в діалізний мішечок.

6. Ретельно зав'язати мішечок зверху, залишивши довгі кінці ниток, щоб їх потім можна було розв'язати.

7. Перенести діалізний мішечок з суспензією у склянку з 500 мл Na-фосфатного буфера з рН 7,4 так, щоб суспензія ліпиду була під рідиною, а верхня частина мішечка над рідиною.

8. Поставити склянку на магнітну мішалку. За допомогою скотч-стрічки зафіксувати систему для діалізу: закріпити нитки, якими зав'язаний мішечок, і верхню частину мішечка до зовнішньої поверхні ємності з буфером.

9. Витримати систему для діалізу на холоді протягом 1 доби.

10. Після діалізу перелити суспензію в колбу. Концентрація отриманих ліпосом – 2 мМ.

Завдання 2. Отримання ліпосом заданого діаметра методом екструзії.

Принцип екструзії полягає в тому, що при продавлюванні суспензії багат шарових ліпосом або ліпосом довільного розміру через мембранний полікарбонатний фільтр з порами певного діаметра вони розбиваються на частинки розміру, що відповідає розмірам пор. Схема зборки екструдера наведена на рис. 2.

1. На тефлонову основу для мембрани поміщають гумове кільце, в центр поміщають краплю буферного розчину та підтримку для мембрани (білий диск). Полікарбонатну мембрану з порами необхідного розміру (прозора плівка) обережно беруть пінцетом з м'якими кінчиками і поміщають зверху. Після цього тефлонову основу обережно поміщають у оправу екструдера. Другу половину екструдера збирають аналогічним чином, але без полікарбонатної мембрани. Акуратно опускають її в оправу екструдера на першу основу мембрани. Необхідно стежити, щоб мембрана була рівною. Зверху поміщають тефловий вкладиш і вручну обережно закручують екструдер гайкою.

2. Перед початком роботи, щоб зменшити втрати суспензії, завчасно змочити деталі екструдера, пропустити через екструдер заповнений буфером шприц, видалити буфер. Нові шприці мають деталі, що щільно прилягають.

Для полегшення екструзії попередньо змочіть циліндр шприца та поршень буфером перед вставкою поршня в циліндр.

3. В один з мікрошприців, що додаються до екструдера, набирають суспензію ліпосом. Поршень порожнього шприца встановлюється на нуль. Після цього мікрошприци обережно вставляють в отвори з обох боків екструдера. Акуратно натискають на поршень заповненого суспензією ліпосом шприца доти, поки заповниться порожній шприц. Акуратно натискають на поршень альтернативного шприца, щоб перенести суспензію знову в перший шприц. Витоку суспензії ліпосом крізь з'єднувальні елементи не має бути!

4. Пропускають суспензію ліпосом через фільтр непарну кількість разів, мінімум 11 разів, щоб кінцевий зразок перейшов до альтернативного шприца. Таким чином зменшується імовірність забруднення препарату ліпосом більш крупними везикулами або сторонніми домішками. Екструзію здійснюють у термостатованій камері.

5. Виймання шприців із екструдера проводять ПРЯМИМИ рухами. Видалення під кутом призводить до розтріскування шприца!

6. Отриману суспензію ліпосоми обережно переносять до мікропробірки.

7. Під час експерименту зберігайте препарат ліпосом вище за температуру T_c ліпиду.

8. Зберігають суспензію ліпосом при температурі 4°C. Не заморожувати! Пам'ятайте, що отримані препарати не стабільні при зберіганні у водних середовищах понад 3-4 дні при температурі 4°C. Зберігання за більш високих температур і рН 8 призводить до псування препарату.

9. Перед використанням нового ліпідного препарату ретельно очистіть екструдер.

Завдання 3. Визначення розміру ліпосом.

Ефективним методом визначення розміру ліпосом є метод спектра каламутності дисперсних систем. Каламутність – показник, який характеризує зменшення прозорості суспензії внаслідок наявності в ній неорганічних і органічних дрібнодисперсних частинок. Зміну стану ліпосом можна зареєструвати за оптичною густиною D , виміряною при фіксованій довжині хвилі λ . Дійсно, збільшення D (зменшення пропускання світла – T) при обраній λ відбувається внаслідок агрегації ліпосом та зростання їх розміру при додаванні якогось чинника або при зростанні температури. Якщо вимірювати D в інтервалі 400–600 нм, де складові суспензії ліпосом не поглинають світло, то можна визначити середній діаметр частинок d_{lip} та їх кількість в одиниці об'єму N . Плавний характер спектра каламутності $\tau = \tau(\lambda)$ в досліджуваному інтервалі $\Delta\lambda$ дозволяє використовувати співвідношення Ангстрема:

$$\tau \approx \lambda^{-n}$$

для визначення τ за формулою:

$$\tau = 2,3D/l,$$

де l – довжина оптичного шляху,

$n = n(\alpha, m)$ – хвильова експонента або характеристична функція світлорозсіяння, яка залежить від відносного розміру α і відносного показника заломлення ліпідних везикул ($m = m_{lip} / m_0$, m_{lip} – показник заломлення ліпосом, $m_0 = 1,33$ – показник заломлення буфера (фізіологічний розчин)). Величина n визначається з графіка залежності $\lg D$ від $\lg \lambda$:

$$n_\lambda = -\frac{\Delta \lg D}{\Delta \lg \lambda}.$$

Середній діаметр ліпідних везикул d_{lip} розраховують за співвідношенням:

$$d_{lip} = \frac{\alpha \lambda^*}{\pi m_0},$$

де λ^* – довжина хвилі, яка відповідає середині інтервалу довжини хвиль, в якому вимірюють спектр каламутності (400–600 нм).

Значення відносного розміру ліпосом α , які відповідають певним n і m , знаходять за допомогою таблиць характеристичних функцій світлорозсіювання.

1. Виміряти спектр каламутності суспензій ліпосом, отриманих методом інжекції (№1) та методом екструзії (№2) в діапазоні від 400 до 600 нм. Дані занести в таблицю 1.

Таблиця 1

Спектри каламутності суспензій ліпосом

λ , нм		410	420	430	440	450	460		600
D_1 , відн. од.									
D_2 , відн. од.									

2. Побудувати графіки залежності $\lg D$ від $\lg \lambda$ та визначити n_λ .

3. За довідниковими таблицями характеристичних функцій світлорозсіяння (знаходяться в лабораторії) визначити відносний розмір ліпосом α та розрахувати середній діаметр d_{lip} . Порівняти отримані дані та перевірити якість приготування зразка №2.

Завдання 4. Зробити висновки.

Завдання 5. Розв'язати задачі.

1. Розрахувати молярне співвідношення між ліпідом і білком в мембрані, що містить 40 % ліпиду і 60 % білка, якщо середня молекулярна маса ліпиду складає 800 Да, а білка – 50 000 Да.

2. Коефіцієнт пропускання розчину $T=0,3$. Чому дорівнює оптична щільність розчину?

3. Оптична щільність розчину $D=0,8$. Знайдіть його коефіцієнт пропускання.

4. При проходженні через шар речовини інтенсивність світла з довжиною хвилі λ_1 зменшується в 4 рази внаслідок поглинання. Інтенсивність світла з довжиною хвилі λ_2 з тієї ж причини зменшується втричі. Знайдіть товщину шару речовини та показник поглинання для світла з довжиною хвилі λ_2 , якщо для світла з довжиною хвилі λ_1 він дорівнює $k_1=0,02 \text{ см}^{-1}$.

5. При проходженні світла через шар розчину поглинається $1/3$ первинної світлової енергії. Визначте коефіцієнт пропускання та оптичну щільність розчину.

Завдання 6. Виконати тестові завдання.

1. Нанобіофізика вивчає об'єкти, розмір яких менше:

- a) 10^{-6} м;
- b) 10^{-9} м;
- c) 10^{-7} м;
- d) 10^{-12} м.

2. До якої групи відносяться ліпіди, які побудовані із залишків спиртів і вищих жирних кислот:

- a) простих;
- b) складних;
- c) гліколіпідів;
- d) похідних ліпідів?

3. Яка група ліпідів характеризується наявністю у складі їх молекул вуглеводів та їх похідних:

- a) глікопротеїни;
- b) похідні ліпідів;
- c) сфінгомієліни;
- d) гліколіпіди?

4. Похідним якої сполуки є холестерин:

- a) фосфатидилхоліну;
- b) циклопентанпергідрофенантрону;
- c) фосфатидилсерину;
- d) сфінгозину?

5. До якої групи ліпідів належать лецитини:

- a) фосфатидилсеринів;

- b) фосфатидилхолінів;
- c) фосфатидилетаноламінів;
- d) фосфатидилінозитів?

6. Які функції виконують ліпіди в організмі:

- a) є структурними компонентами біомембран;
- b) є формою, в якій запасається метаболічне паливо;
- c) є формою транспортування палива;
- d) несуть генетичну інформацію;
- e) захисну;
- f) каталітичну?

7. В яких розчинниках розчиняються ліпіди:

- a) вода;
- b) водні буферні розчини;
- c) бензол;
- d) ацетон;
- e) хлороформ;
- f) спирт?

8. Нанорозмірними вважаються об'єкти з розмірами:

- a) 100 мкм;
- b) від 1 до 50 мкм;
- c) від 1 до 100 нм;
- d) від 0,1 до 100 мкм.

9. Головні структурні складові біологічних мембран незалежно від їх функції:

- a) подвійний ліпідний бішар і асоційовані з ним білки;
- b) гідрофільні голівки та гідрофобні хвости ліпідного бішару;
- c) тришарова структура ліпід-білкових комплексів;
- d) багат шарова структура мембрани, сформована з ліпідів.

10. Здатність фосфоліпідних молекул формувати у водному розчині везикули забезпечується:

- a) будовою та хімічними властивостями молекул ліпідів;
- b) набором ліпідних молекул;
- c) співвідношенням ліпідних і білкових молекул.

11. Молекулярні взаємодії, які забезпечують формування ліпідних бішарів:

- a) електростатичні;
- b) гідрофобні;
- c) ковалентні;
- d) водневі.

Контрольні питання

1. На які три групи за хімічним складом та фізико-хімічними властивостями поділяють ліпіди?
2. Які наноструктури формуються з ліпідів у водному розчині?
3. Який механізм самозбірки ліпідних бішарів чи везикул?
4. Що таке каламутність, оптична щільність і як вони пов'язані між собою?
5. Для яких систем застосовується метод спектра каламутності?
6. На яких приладах здійснюється визначення спектрів каламутності?
7. Як визначається відносний показник заломлення?
8. Закон Ламберта–Бера–Бугера для дисперсних систем.
9. Які вам відомі напрямки практичного застосування ліпосомальних форм?

Рекомендована література

1. Vanniasinghe A. S., Bender V., Manolios N. The Potential of Liposomal Drug Delivery for the Treatment of Inflammatory Arthritis. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*. 2009. Vol. 39, Is. 3. P. 182-196.
2. Шульга С. М. Ліпосоми і наносоми: структура, властивості, виробництво. *Biotechnologia Acta*. 2013. V. 6, No 5. P. 19-40.
3. Кісякова М. О., Гаврилюк Г. П., Воронкова О. С., Сірокваша О. А., Вінніков А. І. Ліпосоми: структура, властивості. Способи введення в організм із терапевтичною метою. *Вісник Дніпропетровського університету. Біологія. Екологія*. 2010. Вип. 18, Т. 1. С. 52–57.
4. Мчедлов-Петросян М. О., Лебідь В. І., Глазкова О. М., Лебідь О. В. Колоїдна хімія : підручник. Харків : ХНУ імені В. Н. Каразіна, 2012. 500 с.
5. Mishchenko M. I., Travis L. D., Lacis A. A. Scattering, absorption, and emission of light by small particles. Third electronic release. Cambridge: University Press, 2002. 486 p.
6. Klenin V. J., Shchyogolev S. Yu. Spectroturbidimetric titration of polymer solutions. *Journal of Polymer Science: Polymer Symposia*. 1973. № 42. P. 965-972.
7. *Liposomes. Methods and Protocols*. (Methods in Molecular Biology 1522). 2nd Ed. Ed. by D'Souza G. G. M. Humana Press. 2017. 296 p.
8. <https://avantilipids.com/products/equipment/category/mini-extruder>

Лабораторна робота № 6



ВИЗНАЧЕННЯ ПРОНИКНОСТІ ЕРИТРОЦИТІВ ДЛЯ ІОНІВ КАЛІЮ МЕТОДОМ ІОНОСЕЛЕКТИВНИХ ЕЛЕКТРОДІВ

Мета роботи: дослідити проникність мембран еритроцитів для іонів калію в модельних умовах, отримати тимчасову залежність виходу іонів калію з еритроцитів.

Підготовка до роботи. Повторити наступні питання:

1. Особливості будови плазматичної мембрани еритроцита.
2. Види переносу речовин через плазматичну мембрану. Пасивний транспорт (пасивна дифузія, дифузія за допомогою каналу, дифузія за допомогою переносника). Активний транспорт, вторинно-активний транспорт. Механізми транспорту іонів калію через мембрану еритроцита.
3. Особливості будови і принцип роботи іоноселективного електрода.

Визначення концентрації іонів у складних сумішах, якими є біологічні розчини, успішно здійснюється із застосуванням іоноселективних електродів. Іоноселективний електрод – це електрод, який чутливий по відношенню до певних іонів у середовищі, а його рівноважний потенціал у розчині електроліту, залежить від концентрації цих іонів. Найбільш характерним прикладом таких електродів є скляний електрод, потенціал якого залежить тільки від активності селективних іонів. Потенціометричне визначення активності того чи іншого іона в розчині дозволяє визначити його концентрацію. Спеціальні скляні іоноселективні електроди чутливі по відношенню до іонів водню, натрію, калію і срібла.

Скляний електрод складається з електрода порівняння (зазвичай хлор-срібний електрод), який занурено у розчин електроліту (для селективних електродів по відношенню до іонів водню – це розбавлена соляна кислота, для селективних електродів по відношенню до іонів калію – це насичений розчин KCl). Електрод порівняння і електроліт поміщають у скляну трубку зі спеціального скла з видutoю на кінці тонкостінною скляною кулькою (скляна провідна мембрана). Така конструкція утворює зовнішній електрод порівняння. Потенціал зовнішнього електрода порівняння постійний, а різниця потенціалів, що виникає на скляній мембрані, є функцією різниці активностей селективних іонів в електроліті всередині електрода і в досліджуваному розчині.

Потенціал іоноселективного електрода визначається таким чином:

$$E = K - \frac{RT}{z_i F} \ln \frac{a_i}{a'_i} \quad (1)$$

де E – потенціал скляного електрода, K – константа, R – універсальна газова стала, F – стала Фарадея, T – температура, z_i – заряд іона i , a_i – активність іонів у досліджуваному розчині, a'_i – активність іонів у розчині електроліту, що заповнює електрод.

Калієвий іоноселективний електрод має гідратовані внутрішню і зовнішню поверхні скла, з якого виготовлена мембрана. Внутрішня поверхня контактує з насиченим розчином КС1 відомої концентрації, а зовнішня поверхня контактує з розчином, в якому необхідно визначити концентрацію іонів калію. Зовнішня поверхня скла калієвого іоноселективного електрода є іонообмінником з більш сильною спорідненістю до іонів калію, ніж до будь-яких інших катіонів. Це забезпечується спеціальним складом скла, з якого виготовлена скляна мембрана електрода. В результаті адсорбції іонів калію на поверхні електрода створюється позитивно заряджений мікроскопічний шар, що містить надлишок іонів калію. Це і є основна причина виникнення потенціалу на межі розділу скло–розчин.

Проте в цілому система повинна бути електронеутральною. Це означає, що позитивний заряд катіонів і негативний заряд аніонів у загальній масі розчину і на склі рівні.

Існує дві межі розділу скло–рідина, одна з них розділяє скло і досліджуваний розчин, а інша – скло і внутрішній електроліт. При цьому одна з поверхонь скла заряджена негативно по відношенню до іншої. Оскільки в досліджуваному розчині концентрація іонів калію зазвичай менше, ніж у насиченому внутрішньому розчині, зовнішня поверхня негативно заряджена по відношенню до внутрішньої. Потенціал змінюється тільки при зміні концентрації іонів калію в досліджуваному середовищі.

У парі з іоноселективним електродом використовують електрод порівняння з відомим потенціалом, який не залежить від складу досліджуваного розчину. Найчастіше в якості електрода порівняння використовують каломельний електрод. Помістивши індикаторний електрод, потенціал якого змінюється залежно від складу розчину, і електрод порівняння з постійним потенціалом у досліджуваній розчин, ми отримаємо гальванічний елемент. Електрорушійна сила (ЕРС) цього елемента залежить від концентрації іонів, до яких чутливий індикаторний електрод. ЕРС гальванічного елемента такого виду вимірюється потенціометром, а вимірювання концентрації селективних іонів називається потенціометричним.

Структурні особливості біомембран. Біологічним мембранам належить ключова роль у забезпеченні та регуляції фізіологічної активності клітин. Відокремлюючи цитоплазму від зовнішнього середовища і здійснюючи транспорт речовин, мембрани активно беруть участь у підтримці клітинного гомеостазу. Мембрани є місцем локалізації найважливіших поліфункціональних ферментних комплексів.

Мембрани відіграють визначальну роль у процесі обміну клітин інформацією з зовнішнім середовищем. Практично всі клітинні функції прямо або опосередковано пов'язані з мембранними системами.

Широке застосування для дослідження структури, властивостей і функціонування біомембран отримали еритроцити крові і препарати мембран еритроцитів. Червоні кров'яні клітини, або еритроцити (від грец. erythros – червоний і cytos – вмістилище, тут – клітина) – високоспецифічні клітини крові тварин і людини, містять найважливіший транспортний білок гемоглобін. Суха речовина еритроцита людини містить близько 95 % гемоглобіну і 5 % інших речовин – білків і ліпідів. Еритроцити є порівняно простими клітинами, позбавленими ядра, мітохондрій та інших внутрішньоклітинних органел. У еритроцитів є тільки цитоплазматична мембрана, яка відокремлює цитоплазму від зовнішнього середовища.

Транспорт іонів і полярних молекул крізь плазматичну мембрану еритроцита здійснюється завдяки процесам активного і пасивного транспорту.

Активний транспорт – це транспорт проти градієнта концентрації речовини, що вимагає спеціальних джерел енергії. Прикладом систем активного транспорту іонів є Na^+/K^+ -АТФаза плазматичних мембран клітин тварин, яка «викачує» з клітки іони натрію в обмін на іони калію, витрачаючи на виконання цієї роботи АТФ у стехіометрії $3\text{Na}^+/2\text{K}^+/1\text{АТФ}$. Ca^{2+} -АТФаза здійснює активний транспорт кальцію через мембрану зі стехіометрією $2\text{Ca}^{2+}/1\text{АТФ}$.

Пасивний транспорт – це транспорт речовин за їх градієнтом концентрації без витрат енергії. Пасивний транспорт включає механізми простої і полегшеної дифузії.

Проста дифузія передбачає перенесення речовини через мембрану з області більшої концентрації в область з меншою концентрацією. Закон простої дифузії справедливий тільки для незаряджених та нейтральних молекул.

Полегшена дифузія передбачає два шляхи переносу речовин та іонів через мембрани: 1) за допомогою каналів, 2) за допомогою «переносників».

Полегшена дифузія через мембранні канали можлива завдяки білкам-каналоутворювачам. Вони формують трансмембранні гідрофільні канали, через які іони і молекули розчинених речовин відповідних розмірів і заряду можуть проходити через бішар шляхом простої дифузії.

Виконання роботи

Лабораторне обладнання та матеріали: цифровий вольтметр; іоноселективний (для іонів K^+) електрод; електрод порівняння; центрифуга лабораторна; центрифужні ваги; центрифужні пластикові пробірки; цільна

донорська кров; склянки хімічні (50 мл) – 8 шт.; фізіологічний розчин; розчин KCl (0,1 М), приготований на фізіологічному розчині; дозаторні піпетки; штатив для електродів.

Завдання 1. Побудова калібрувальної кривої для K^+ -іоноселективного електрода.

1. Увімкнути вольтметр і залишити для прогрівання на 5 хв.

2. Використовуючи базовий розчин KCl (0,1 М), приготувати набір розчинів KCl (на фізіологічному розчині) з відомими концентраціями: 0,01 М, 0,001 М, 0,0001 М, 0,00001 М і нульову пробу – чистий фізіологічний розчин. Кількість розчину в кожній зі склянок має бути близько 20 мл (решту злити).

Увага! Для приготування зазначених розчинів необхідно користуватися хімічним посудом, вимитим дистильованою водою. Між вимірами електроди потрібно не менше двох разів промивати, занурюючи їх у склянку з дистильованою водою, воду щоразу змінювати.

3. Занурити електрод у склянку з фізіологічним розчином і, почекавши 3 хв, записати показники вольтметра.

4. Повторити завдання п. 3 для решти розчинів, починаючи з найменшої концентрації KCl.

5. Занурити електроди в склянку з дистильованою водою, змінити воду і залишити їх так до наступного вимірювання.

6. Записати отримані дані в таблицю та побудувати калібрувальну криву для K^+ -іоноселективного електрода (графік залежності потенціалу від концентрації KCl в розчині) у напівлогарифмічних координатах $U(\lg C)$.

C, М						
U, мВ						

Завдання 2. Вивчення проникності мембрани еритроцитів для іонів калію.

1. Налити в центрифужну пробірку 20 мл фізіологічного розчину і додати туди за допомогою піпетки 3 мл цільної крові.

2. На центрифужних вагах ретельно врівноважити пробірки.

3. Вставити пробірки в діаметрально протилежні гнізда ротора центрифуги, загвинтити кришку і центрифугувати 5 хв при 3000 об/хв.

4. Дочекатись повної зупинки ротора, витягти пробірки з ротора, а надосадову рідину вилити (якщо надосадова рідина виявиться забарвленою, то необхідно повторити відмивання).

5. Додати до осажденої еритромаси 10 мл фізіологічного розчину і акуратно перемішувати скляною паличкою до утворення однорідної суспензії еритроцитів. У момент додавання фізіологічного розчину відмітити час (t_0).

6. Зрівноважити пробірки на центрифужних вагах і центрифугувати як у п. 3.

7. Надосадову рідину акуратно злити в склянку і виміряти концентрацію іонів калію в ній.

8. Після вимірювання вилити рідину назад у пробірку, перемішати скляною паличкою і витримати наступні 15 хв. Врівноважити та відцентрифугувати згідно з п. 3.

9. Визначити концентрацію в надосадовій рідині.

10. Повторити дослід, як зазначено в пунктах 8-9, та заповнити таблицю отриманими експериментальними даними, дотримуючись запропонованих часових інтервалів. Період спостереження з початку дослідів ($t = 0$) до його завершення – 75 хвилин.

t , хв	0	15	30	45	60	75
U , мВ						

11. Побудувати криву часової залежності виходу іонів калію $C(t)$ з еритроцитів.

Завдання 3. Зробити висновки.

Завдання 4. Розв'язати задачі.

1. Чому рівноважний потенціал для іонів K^+ –100 мВ, а для іонів Na^+ +41 мВ, хоча обидва є позитивно зарядженими іонами?

2. У скільки разів зовнішня концентрація іонів натрію повинна перевищувати внутрішню, щоб рівноважний потенціал Нернста становив +50 мВ при температурі 27°C?

3. Визначити рівноважний мембранний потенціал на бішаровій ліпідній мембрані, який створений іонами калію при температурі 20°C, якщо концентрація калію з одного боку мембрани дорівнює 10^{-3} М, а з іншого – 10^{-5} М.

4. При фізіологічних умовах мембранний потенціал становить -65 мВ. Яким він буде, якщо встановити зворотні концентрації іонів K^+ і Na^+ по різні боки мембрани?

5. Два розчини іонів літію розділені плоскою ліпідною мембраною. При якому співвідношенні концентрацій іонів на мембрані встановиться рівноважна різниця потенціалів $\Delta\phi = 116$ мВ? Температура середовища 20 °C.

Завдання 5. Виконати тестові завдання.

1. В який спосіб здійснюється вихід іонів калію в розчин при інкубуванні еритроцитів у фізіологічному розчині:

- а) дифузія;
- б) активний транспорт;
- в) перенос іонів проти градієнта концентрацій?

2. Пасивний транспорт іонів – це:

- a) перенос іонів за градієнтом концентрацій без витрат енергії;
- b) перенос іонів проти градієнта концентрацій без витрат енергії;
- c) перенос іонів за градієнтом концентрації з витратами енергії;
- d) перенос іонів проти градієнта концентрацій з витратами енергії.

3. Які властивості іоноселективного електрода дозволяють оцінити концентрацію іонів у розчині:

- a) чутливість електрода до величини потенціалу, що створюють іони в розчині;
- b) чутливість електрода до іонів, що визначаються, та залежність його рівноважного потенціалу від концентрації цих іонів у розчині;
- c) чутливість електрода до іонів, що визначаються, при цьому його рівноважний потенціал не залежить від концентрації цих іонів у розчині?

4. Якими каналами переносяться іони калію з клітини:

- a) K-канал;
- b) K, Na-канал;
- c) пора?

5. Дайте визначення дифузії:

- a) перенос речовини, який не залежить від концентрації цієї речовини;
- b) перенос речовини з витратами енергії;
- c) перенос речовини, який визначається градієнтом концентрації цієї речовини;

d) перенос речовини проти градієнта концентрації з витратами енергії.

6. За яких умов не буде здійснюватися вихід іонів калію з еритроцитів у середовище:

- a) концентраційного переважання іонів калію в розчині;
- b) концентраційної рівноваги іонів калію в розчині та в еритроциті;
- c) вихід іонів калію з еритроцитів буде здійснюватися за будь-яких умов?

7. Потенціал іоноселективного електрода визначається таким чином:

- a) $E = K + \frac{z_i F}{RT} \ln \frac{a_i}{a'_i}$;
- b) $E = K + \frac{F}{RT} \ln \frac{a_i}{a'_i}$;
- c) $E = K + \frac{RT}{F} \ln \frac{a_i}{a'_i}$;
- d) $E = K + \frac{RT}{z_i F} \ln \frac{a_i}{a'_i}$.

8. Яка природа потенціалів на біологічних мембранах:

- a) електронна;
- b) протонна;
- c) іонна?

9. Джерелом енергетичних витрат для забезпечення активного транспорту іонів через клітинну мембрану є:

- a) концентраційний градієнт;

б) енергія АТФ;

с) ваш варіант.

10. У якому співвідношенні знаходяться проникності мембрани для іонів калію, натрію та хлору у спокої:

$P_K:P_{Na}:P_{Cl}=0,5:0,04:0,45$;

$P_K:P_{Na}:P_{Cl}=1:0,4:0,5$;

$P_K:P_{Na}:P_{Cl}=1:0,04:0,45$?

Контрольні питання

1. Поясніть принцип визначення концентрації іонів калію в розчині за допомогою іоноселективного електрода.

2. Дайте визначення пасивного транспорту іонів через клітинну мембрану.

3. За якими каналами переносяться іони калію з клітини?

4. Чому відбувається вихід іонів калію з еритроцитів у розчин при інкубації клітин у фізіологічному розчині?

5. За яких умов не здійснюватиметься вихід іонів калію з еритроцитів у середовище?

6. Вихід іонів калію з еритроцитів – це є гемоліз? Відповідь поясніть.

7. Чому в лабораторній роботі експериментально визначається величина потенціалу, а висновок робиться про зміну концентрації іонів калію в розчині? Поясніть відповідь.

8. Проаналізуйте часову залежність виходу іонів калію, отриману в роботі.

Рекомендована література

1. Костюк П. Г., Зима В. Л., Магура І. С., Мірошніченко М. С., Шуба М. Ф. Біофізика / за ред. П. Г. Костюка. Київ : Обереги, 2001. 544 с.

2. Шуба М. Ф., Давидовська Т. Л., Прилуцький Ю. І., Жолос О. В., Богуцька К. І. Електробіофізика. Київ : Фітосоціоцентр, 2002. 152 с.

3. Давидовська Т. Л., Мірошніченко М. С., Прилуцький Ю. І., Жолос О. В. Теоретичні та експериментальні основи біофізики електричних явищ. Київ : Фітосоціоцентр, 2006. 190 с.

4. Шуба Я. М. Основи молекулярної фізіології іонних каналів. Київ : Наукова думка, 2010. 447 с.

5. Юрченко О. І., Бугаєвський О. А., Дрозд А. В., Мельник В. В., Холін Ю. В. Аналітична хімія. Загальні положення. Рівноваги. Якісний та кількісний аналіз : навч. посібник / за ред. О. І. Юрченка. Харків : ХНУ імені В. Н. Каразіна, 2012. 418 с.

6. Hille B. Ion channels of excitable membranes. 3rd Edition. Sunderland, Massachusetts, USA: Sinauer Associates, 2001. 814 p.

7. Центрифугування зразків крові – мета, кроки, методи. <https://microbiologynote.com/centrifuge-blood-sample-purpose-steps-techniques/>.

Лабораторна робота № 7



ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЇ І РОЗМІРІВ КЛІТИН МЕТОДОМ СВІТЛОПОЛЬНОЇ МІКРОСКОПІЇ

Мета роботи: визначення розмірів клітин та їх концентрації за допомогою мікроскопа.

Підготовка до роботи. Повторити наступні питання:

1. Принцип роботи мікроскопа. Хід променів у мікроскопі.
2. Особливості будови камери Горяєва. Принцип підрахунку об'єктів у камері Горяєва.

За допомогою мікроскопа вивчають морфологію і будову клітин, їх ріст і розвиток. Мікроскопи дозволяють одержати збільшення в сотні разів (світлові мікроскопи) і десятки–сотні тисяч разів (електронні мікроскопи) зображення досліджуваних зразків.

Конструкція мікроскопа. Мікроскоп складається з двох частин: механічної (підсобної) і оптичної (головної).

Механічна частина мікроскопа. До неї відноситься штатив, предметний столик і тубус (труба). До штатива примикає коробка механізмів, система зубчастих коліс для регуляції положення тубуса. Система приводиться в рух обертанням макрометричного і мікрометричного гвинтів.

Макрометричний гвинт слугує для попередньої орієнтовної установки зображення досліджуваного об'єкта на фокус.

Мікрометричний гвинт використовують для подальшої, більш чіткої установки на фокус. При повному повороті мікрометричного гвинта тубус пересувається на 0,1 мм (100 мкм). При обертанні гвинтів за годинниковою стрілкою він опускається у напрямку до препарату, при обертанні проти – від препарату.

На **предметний столик** поміщають препарат з об'єктом дослідження. Предметний столик обертається і переміщується у взаємно перпендикулярних площинах за допомогою гвинтів. У його центрі знаходиться отвір для освітлення препарату знизу променями світла, що направляються дзеркалом мікроскопа. На столику вмонтовані два затискачі (клеми) – пружні металеві пластинки, призначені для закріплення препарату.

Тубус – оправа, в яку укладені елементи оптичної системи мікроскопа. До нижньої його частини прикріплюють револьвер (утримувач об'єктива) з гніздами для об'єктивів. Сучасні моделі мікроскопів мають нахилений тубус з дугоподібним тубусотримачем, що забезпечує горизонтальне положення предметного столика.

Оптична частина мікроскопа. Вона складається з основного оптичного вузла (об'єтив і окуляр) та допоміжної освітлювальної системи (дзеркало і конденсор). Всі частини оптичної системи строго центровані у відношенні один до одного. У багатьох сучасних мікроскопах дзеркало і конденсор замінені вмонтованим у прилад регульованим джерелом світла.

Освітлювальна система знаходиться під предметним столиком. Дзеркало відображає падаюче на нього світло в конденсор. *Конденсор* (лат. *condenso* – ущільнюю, згущаю), що складається з 2–3 короткофокусних лінз, збирає промені, що йдуть від дзеркала, і направляє їх на об'єкт. *Лінзи конденсора* вмонтовані в металеву оправу, з'єднану з зубчастим механізмом, що дозволяє переміщати конденсор вгору і вниз спеціальним гвинтом. Для регулювання інтенсивності освітлення в конденсорі є *ірисова (кулькова) діафрагма*, що складається зі сталевих серповидних пластинок. Для отримання більш чіткого зображення досліджуваного об'єкта важливо відрегулювати ступінь розкриття діафрагми. Пофарбовані препарати краще розглядати при майже повністю відкритій діафрагмі, незабарвлені – при зменшеному отворі діафрагми.

Об'єтив – найбільш важлива частина мікроскопа. Це багатолінзова короткофокусна система, від якості якої залежить в основному зображення об'єкта. Зовнішня лінза, звернена плоскою стороною до препарату, називається фронтальною, вона забезпечує збільшення. Решта лінз у системі об'єктива виконують, переважно, функції корекції оптичних недоліків, що виникають при дослідженні об'єктів.

Об'єктиви бувають сухі і заглибні (імерсійні). При роботі з сухими об'єктивами між фронтальною лінзою об'єктива і об'єктом дослідження знаходиться повітря. Оптичний розрахунок імерсійних об'єтивів передбачає їх роботу при зануренні фронтальної лінзи об'єктива в рідке однорідне середовище. При роботі з *сухим* об'єктивом внаслідок різниці показника заломлення скла (1,52) і повітря (1,0) частина світлових променів відхиляється і не потрапляє в око спостерігача. При роботі з *імерсійним* об'єктивом необхідно між покривним склом і лінзами об'єктива помістити кедрове масло, показник заломлення якого близький до показника заломлення скла.

Об'єктиви розрізняють щодо їх збільшення. Власне збільшення (V) об'єтивів визначають за формулою

$$V = \frac{l}{f}, \quad (1)$$

де l – оптична довжина тубуса або відстань між фокальною площиною об'єктива і площиною зображення, для різних об'єтивів вона коливається в діапазоні 128–180 мм; f – фокусна відстань об'єктива. Чим більше фокусна відстань, тим менше збільшення об'єктива.

У об'єктивів з малим збільшенням відстань від фронтальної лінзи об'єктива до препарату більше, ніж у об'єктивів з великим збільшенням. Залежно від цього необхідно строго стежити, яким гвинтом (макрометричним або мікрометричним) слід користуватися при фокусуванні об'єктива.

Роздільна здатність d – одна з важливих характеристик об'єктива, яка визначає найменшу відстань між двома точками на препараті, які буде видно роздільно. Роздільна здатність мікроскопа обумовлюється дифракцією світла на деталях досліджуваного об'єкта. Роздільна здатність об'єктива залежить від його числової апертури і довжини хвилі світла, при якій іде спостереження об'єкта. Математично така залежність виражається формулою

$$d = \frac{\lambda}{A}, \quad (2)$$

де λ – довжина хвилі світла, яка сприймається людським оком (0,4–0,7 мкм, звідси середня довжина хвилі становить 0,55 мкм); A – числова апертура об'єктива.

При роботі зі світловим мікроскопом величина λ постійна, оскільки об'єкти досліджуються при звичайному світлі ($\lambda=0,55$ мкм). Отже, межа роздільної здатності залежить виключно від можливості підвищення числової апертури A .

Числова апертура об'єктива характеризує його *світлозбірну здатність* і визначається за формулою

$$A = n \cdot \sin \frac{\alpha}{2}, \quad (3)$$

де n – показник заломлення світлового променя, який проходить через предметне скло в середовище, що знаходиться між фронтальною лінзою об'єктива і предметним склом; α – кут, одна сторона якого збігається з оптичною віссю, інша утворена лінією, що з'єднує точку виходу ефективних променів з об'єктива з межею діючого отвору об'єктива; $\frac{\alpha}{2}$ – кут вхідного отвору об'єктива.

Важливо, щоб величина n була максимальною. На практиці це досягається використанням імерсійних об'єктивів з введенням кедрової олії ($n=1$) між покривним склом і лінзами об'єктива. Подальшого підвищення n можна досягти введенням середовища з n більш високим, ніж у скла.

Роздільна здатність мікроскопа. Ця характеристика особливо важлива при дослідженні мікрооб'єктів та їхніх структур. Максимальна роздільна здатність світлового мікроскопа 0,2 мкм. Роздільна здатність мікроскопа тим краще, чим менше абсолютна величина d .

Окуляр є безпосереднім продовженням лінз людського ока. Окуляр складається з двох лінз – очної (верхньої) і польової, або збиральної (нижньої), укладених в металеву оправу. Призначення польової лінзи – збирати промені, що йдуть від об'єктива, таким чином, щоб вони проходили через маленький отвір очної лінзи.

Призначення окуляра полягає в прямому уявному збільшенні того дійсного зворотного і збільшеного зображення, яке дає об'єктив.

Збільшувальна здатність мікроскопа: коефіцієнт збільшення мікроскопа визначається добутком збільшення окуляра (K) і збільшення об'єктива (V) і виражається формулою: $D=K \cdot V$.

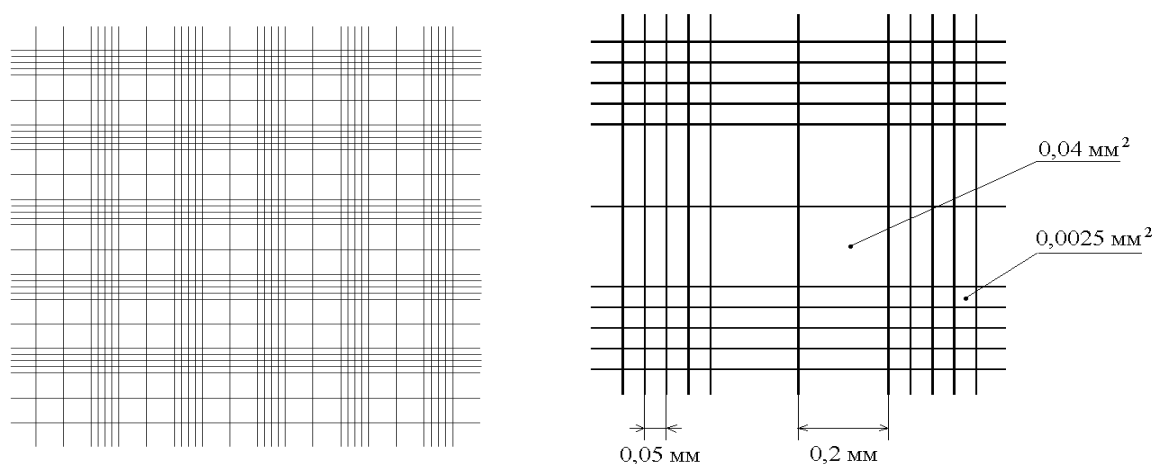
Принцип роботи з лічильною камерою Горяєва

У клінічній лабораторній практиці для підрахунку кількості клітин і визначення їх концентрації поширене застосування лічильної камери Горяєва. Це спеціальне предметне скло з добре полірованою оптично плоскою поверхнею і нанесеними на ній квадратами (лічильна площа камери Горяєва). Застосовується в поєднанні зі спеціальним товстим покривним склом (товсте скло не схильне до деформації, яка може призвести до помітних помилок у величині об'єму комірки).



Рис. 1. Загальний вигляд камери Горяєва

На рис. 1 зображена лічильна камера Горяєва. Це товсте предметне скло з виїмками для надлишків досліджуваної суспензії і двома робочими майданчиками. Рівень робочих майданчиків менше, ніж у інших, на 0,1 мм, це потрібно для того, щоб між майданчиком і покривним склом утворився зазор. На робочі майданчики нанесена сітка (рис. 2). Сітка виконана таким чином, що на ній є квадрати різного розміру. Залежно від розміру об'єктів, що підраховуються, та їх кількості користуються квадратами більшого або меншого розміру.



*Рис. 2. Лічильна площа камери Горяєва
з вказаними параметрами сітки*

Нанесена сітка в камері Горяєва, при її заповненні рідиною, обмежує аліквоти суспензії певного об'єму (для різних моделей лічильної камери ця величина може бути різною) так, що підраховане середнє число клітин на одиницю площі означає їх число на одиницю об'єму рідини. Помилки у підрахунках виникають в результаті нерівномірного розподілу клітин між квадратами камери. Необхідно здійснювати підрахунки у великій кількості квадратів, які взяті випадковим чином для кожної проби. При цьому слід дотримуватися *правила Бюркера*: у квадратах рахувати ті клітини, що містяться в площині квадрата сітки, а також на межах його верхньої та лівої сторін. Це потрібно для того, щоб двічі не рахувати клітини, що містяться на межах суміжних квадратів.

Як правило, перед підрахунками суспензію клітин розводять, оскільки концентровані суспензії містять занадто багато частинок на одиницю площі, що ускладнює підрахунки. Розведення вибирають так, щоб було зручно здійснювати перерахунки, наприклад, 1×10 , 1×100 , 1×200 і т.д. Розведення враховується при остаточному розрахунку концентрації клітин.

Виконання роботи

Лабораторне обладнання та матеріали: світловий мікроскоп «Биолам-70», камера Горяєва, об'єкт-мікрометр, хімічні склянки, скляні палички, мірний посуд, покривні стекла, фізіологічний розчин, суспензія дріжджових клітин, фільтрувальний папір.

Завдання 1. Визначення ціни поділки шкали окуляра мікроскопа при різному збільшенні.

1. Виберіть потрібний об'єтив ($\times 20$) поворотом револьвера мікроскопа з об'єктивами.

2. Помістіть на предметний столик мікроскопа об'єкт-мікрометр – предметне скло, на поверхні якого нанесена еталонна мікрометрична шкала

з відомою ціною поділки. Отримайте чітке зображення штрихів об'єкта-мікрометра в окулярі мікроскопа шляхом установки оптимального освітлення (повертаючи дзеркало в двох площинах і налаштовуючи конденсор) і настройки фокусування зображення (грубим, а потім плавним регулюванням).

3. Якщо шкалу окуляра видно недостатньо чітко, обертаючи лімб на окулярі, отримайте більш чітке зображення шкали.

4. Досягніть того, щоб штрихи об'єкт-мікрометра були паралельні штрихам окулярної шкали (повертаючи окуляр в тубусі).

5. Підрахуйте кількість поділок окулярної шкали (n), що припадають на кілька штрихів об'єкт-мікрометра.

6. Знаючи інтервал між штрихами об'єкт-мікрометра (вказано на металевій оправі), визначити ціну поділки окулярної шкали.

7. Визначити ціну поділки окулярної шкали для об'єктива з іншим збільшенням ($\times 40$ або $\times 10$).

Завдання 2. Визначення глибини лічильної камери.

1. Помістіть камеру Горяєва на предметний столик і накрийте її товстим покривним склом, притираючи його до скла камери.

2. Відповідно до рекомендацій у першому завданні, отримайте чітке зображення сітки камери (об'єктив з 20-кратним збільшенням).

3. Плавним регулюванням (гвинт з мікрометричною шкалою) сфокусуйте мікроскоп на сітку (дно камери) так, щоб колір ліній сітки був на кордоні між світлим і темним. Запам'ятайте показання мікрометричної шкали на ручці плавного фокусування.

4. Сфокусуйте мікроскоп (ручкою точного фокусування) на нижню поверхню покривного скла (верхня межа камери), при цьому потрібно відрахувати кількість поділок, на які повернулася ручка фокусування. Знаючи ціну поділки (2 мкм), обчислити глибину камери і порівняти її зі вказаною.

5. Визначені параметри мікроскопа (n – ціну поділки шкали окуляра) і камери Горяєва (h – глибину комірки) занести в таблицю.

№	n , мм	h , мм	№	n , мм	h , мм
1			3		
2			...		

Завдання 3. Визначення концентрації клітин в суспензії.

1. Розбавити суспензію клітин. Наприклад: 400-кратне розведення крові фізіологічним розчином (0,125 мл крові на 50 мл фізіологічного розчину); 4-5-кратне розведення суспензії дріжджових клітин. Ретельно перемішати отриману суспензію клітин скляною паличкою.

2. Помістити на предметний столик камеру Горяєва з притертим до неї покривним склом.

3. Повільно набрати суспензію клітин дозаторною піпеткою. Нанести в області робочого майданчика під покривне скло невелику кількість суспензії (рідина сама буде затягуватися в камеру капілярними силами). Надлишок розчину виявиться в жолобках.

5. Вибрати об'єкти з 20-кратним збільшенням.

6. Сфокусувати мікроскоп таким чином, щоб було видно і клітини, і сітку камери (вибрати оптимальне налаштування).

7. Почекаати, доки клітини осядуть, і приступити до підрахунків. Для того, щоб отримати найбільш точні дані, необхідно підрахувати кількість клітин у 5 великих квадратах, розташованих у різних місцях сітки. Щоб уникнути дворазового підрахунку клітин, що лежать на межах квадратів, слід користуватися правилами, викладеними в частині **Принцип роботи з лічильною камерою Горяєва**.

8. Провести підрахунок кількості (N) клітин у зразку суспензії за допомогою камери Горяєва: знайти середнє арифметичне число клітин в одному квадраті.

Середнє значення вимірної величини $\bar{x}$:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n},$$

де x_i – виміряна величина, n – число вимірювань.

9. Обчислити об'єм суспензії, що припадає на один квадрат.

10. Обчислити концентрацію клітин (C) в 1 мм^3 суспензії (з урахуванням розведення). Концентрація клітин C виражається як кількість клітин в одиниці об'єму (N в 1 мл).

11. Виконати статистичну обробку даних:

визначити середнє значення концентрації клітин – $\bar{C}$;

середньоквадратичне відхилення концентрації клітин $\sigma = \sqrt{\sum_{i=1}^n \frac{\Delta x_i^2}{n-1}}$;

значення коефіцієнта Стюдента (t) визначити за допомогою таблиці 1 з лабораторної роботи № 2 та з урахуванням числа вимірів (n) і довірчої ймовірності ($\alpha = 0,95$) обчислити довірчий інтервал:

$$\bar{x} - t \cdot \frac{\sigma}{\sqrt{n}} < \mu < \bar{x} + t \cdot \frac{\sigma}{\sqrt{n}}.$$

Заповнити таблицю:

№	N	C	$\bar{C}$	σ	$\bar{C} \pm \Delta x_{0,95}$
1					
2					
3					
...					

Завдання 4. Визначення розміру клітин.

1. Виконати п. 1–3 завдання 3. Замість товстого покривного скла використовувати тонке.

2. Вибрати об'єкти з 40-кратним збільшенням. Отримати в мікроскопі чітке зображення клітин.

3. Рухаючи предметний столик зі зразком, поєднати одну з клітин зі шкалою окуляра. Порахувати кількість поділок шкали, що припадають на одну клітину.

4. Знаючи ціну поділки шкали для вибраного об'єктива (з першого завдання), обчислити розмір (діаметр або довжину і ширину) клітини в мкм. Заповнити таблицю. Порівняти з довідковими даними.

Параметри клітин, мкм	1	2	3	...	...	Середнє значення
L						
W						
D						

Завдання 5. Зробити висновки.

Завдання 6. Розв'язати задачі.

1. Бактеріальна клітина *E. coli* має циліндричну форму, довжина її 2 мкм, діаметр 0,8 мкм, клітина печінки – сферична, діаметром 24 мкм. Розрахувати об'єм і масу цих клітин, приймаючи середню питому густину їх 1100 кг/м³.

2. Які мінімальні розміри клітини можна розглядати в світловому мікроскопі через синій світлофільтр 436 нм, якщо клітина перебуває в імерсійному середовищі з $n = 1,47$? (Прийняти апертурний кут об'єктива 80°.)

3. Визначити роздільну здатність мікроскопа за умов найкращого освітлення для об'єктива: а) безімерсійного з числовою апертурою $A=0,9$; б) з масляною імерсією ($n=1,6$). Розрахунок здійснити для довжини хвилі у вакуумі 550 нм.

4. У скільки разів можна підвищити роздільну здатність мікроскопа, спостерігаючи об'єкти в ультрафіолетових променях ($\lambda_1=270$ нм) у порівнянні зі спостереженням об'єктів у зелених променях ($\lambda_2=550$ нм)?

Завдання 7. Виконати тестові завдання.

1. Однією з найважливіших характеристик мікроскопа як оптичного приладу є величина роздільної здатності, яка залежить від:

- довжини тубуса мікроскопа і фокусної відстані окуляра;
- довжини хвилі світла і відстані найкращого зору;
- довжини хвилі світла і числової апертури;
- показника заломлення і радіуса кривизни лінз.

2. Для збільшення числової апертури об'єтивів у мікроскопії використовують один із зазначених способів:

- a) збільшують освітленість;
- b) змінюють спектральний склад світла;
- c) лінзи окуляра зверху покривають оболонкою з меншим показником заломлення;
- d) простір між об'єктивом і покривним склом заповнюють імерсійною рідиною.

3. Яке явище обмежує можливість зменшувати роздільну здатність оптичного мікроскопа:

- a) інтерференція світла;
- b) дифракція світла;
- c) поляризація світла;
- d) абсорбція світла речовиною?

4. Для дослідження прозорих і безбарвних об'єктів застосовують:

- a) метод фазового контрасту;
- b) поляризаційну мікроскопію;
- c) метод світлого поля у відбитому світлі;
- d) метод темного поля в прохідному світлі.

5. Яке зображення називається уявним:

- a) зображення називається уявним, якщо його не видно;
- b) зображення називається уявним, якщо його не можна сфотографувати;
- c) зображення називається уявним, якщо його не можна побачити на екрані. Його положення будується на продовженнях світлових променів;
- d) зображення називається уявним, якщо воно розташовується перед лінзою?

6. Як зміниться ціна поділки окулярної сітки мікроскопа при заміні об'єктива $\times 20$ на $\times 100$:

- a) залишиться колишньою;
- b) зменшиться в 5 разів;
- c) збільшиться на 80 %;
- d) збільшиться в 100 разів?

7. Які клітини слід враховувати при підрахунку в камері Горяєва:

- a) клітини, що торкаються лівої і нижньої обмежувальних ліній;
- b) клітини, що торкаються правої і верхньої обмежувальних ліній;
- c) клітини, що лежать на лівій і правій межі квадрата;
- d) клітини, що лежать всередині великих квадратів сітки?

8. Для яких цілей на поверхні камери Горяєва нанесена сітка з квадратів з різними розмірами:

- a) для роботи з об'єктами різних розмірів;

- b) недоліки виробника лабораторного обладнання;
 - c) для підрахунку об'єктів різних розмірів і їх концентрації?
9. Точність концентрації клітин в камері Горяєва залежить від:

- a) роздільної здатності мікроскопа;
- b) уважності та компетентності лаборанта;
- c) роздільної здатності мікроскопа і уважності та компетентності дослідника.

10. За допомогою поляризаційного мікроскопа досліджують:

- a) ізотропні прозорі речовини;
- b) анізотропні прозорі речовини;
- c) сполуки, які флуоресціюють;
- d) полярні рідини.

Контрольні питання

1. Які основні характеристики сухих й імерсійних об'єктів мікроскопів? У чому відмінність між сухими й імерсійними об'єктами?
2. Від чого залежить власне збільшення об'єктива? Основні відмінні характеристики об'єктів з малим і з великим збільшенням.
3. Роздільна здатність об'єктива. Від чого залежить величина роздільної здатності?
4. Чим визначається збільшувальна здатність мікроскопа? Дайте визначення корисного збільшення мікроскопа.
5. Які параметри камери Горяєва необхідно знати, щоб можна було за її допомогою оцінити концентрацію досліджуваних клітин?
6. Які параметри біооб'єктів можна визначити за допомогою камери Горяєва?
7. З якою метою і де можуть бути використані лічильні камери?

Рекомендована література

1. Костюк П. Г., Зима В. Л., Магура І. С., Мірошніченко М. С., Шуба М. Ф. Біофізика / за ред. П. Г. Костюка. Київ : Обереги, 2001. 544 с.
2. Філімонов В. І. Фізіологія людини : підручник. Четверте видання. Київ : Медицина, 2021. 448 с.
3. Антонюк В. С., Тимчик Г. С., Бондаренко Ю. Ю., Петльований П. В., Білокінь С. О., Бондаренко М. О. Методи та засоби мікроскопії. Київ : НТУУ «КПІ», 2013. 336 с.
4. Дідух В. Д., Рудяк Ю. А., Багрій-Заяць О. А. Біологічна фізика з фізичними методами аналізу : навчальний посібник. Тернопіль, 2021. 305 с.
5. Alberts B., Bray B., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J. D. Molecular Biology of the Cell. 2nd Edition. Garland Publishing, Inc. New York, London. 1989. 1218 p.

Лабораторна робота № 8



ВИЗНАЧЕННЯ РОЗМІРІВ ЕРИТРОЦИТІВ МЕТОДОМ ДИФРАКЦІЇ ЛАЗЕРНОГО ПРОМЕНЯ

Мета роботи: Дослідження явища дифракції світла на сферичних об'єктах, вимірювання довжини хвилі лазерного випромінювання, визначення розмірів еритроцитів.

Підготовка до роботи. Повторити наступні питання:

1. Явище дифракції світла. Дифракція світла на дифракційній ґратці, хід променів, виведення формул.
2. Дифракція світла на сферичних частинках.
3. Основні характеристики лазерного випромінювання.

Лазер – це пристрій, що генерує когерентні електромагнітні хвилі за рахунок вимушеного випромінювання мікрочастинок середовища, в якому створено високий ступінь збудження одного з енергетичних рівнів. Лазерне випромінювання – це індуковане випромінювання, генерація якого можлива за наступних умов: наявність активного середовища, наявність механізмів збудження активного середовища (або його накачки); наявність позитивного зворотного зв'язку.

За своїми властивостями лазерне випромінювання суттєво відрізняється від випромінювання звичайних джерел світла. Основні характеристики лазерного випромінювання: довжина хвилі (частота випромінювання), монохроматичність, тривалість імпульсу, когерентність.

Довжина хвилі залежить від складу активного середовища та знаходиться в межах від ультрафіолетового випромінювання (220 нм) до інфрачервоного (10 мкм).

Монохроматичність – це характеристика, притаманна випромінюванню з постійним значенням частоти. Критерієм частотної стабільності випромінювання є відношення ширини діапазону випромінюваних хвиль ($\Delta\lambda$) до середнього значення довжини хвилі (λ). Для лазерів ступінь монохроматичності випромінювання високий та складає близько 10^{-5} .

Залежно від інтенсивності випромінювання лазери розподіляються на **непереривні** та **імпульсні**. У перших в активне середовище енергія подається безперервно та потужність лазерного випромінювання постійна за часом, наприклад, гелій-неоновий лазер. В імпульсних лазерах енергія подається короткими порціями, наприклад, висвітлюють лампою-спалахом протягом 1 мс. У відповідь генеруються короткі імпульси випромінювання тривалістю від десятків мікросекунд (10^{-6} с) до декількох наносекунд (10^{-9} с).

Безперервні лазерні джерела характеризуються низькою потужністю випромінювання, тоді як імпульсні мають потужність на декілька порядків

вищу, оскільки вся енергія W випромінюється за короткий час: (τ):

$$P = \frac{W}{\tau}.$$

Когерентність – це узгоджене в часі і просторі протікання декількох коливальних або хвильових процесів. Лазерне випромінювання має високу когерентність за рахунок явища вимушеного випромінювання. Випромінювання, що створюється окремими точками активного середовища, має зсуви фази, що відповідають поширенню однієї плоскої електромагнітної хвилі, так, що з лазера виходить електромагнітна хвиля з постійною фазою і амплітудою.

Оскільки лазерне випромінювання має високу когерентність і монохроматичність, можна вважати, що лазер є джерелом плоскої електромагнітної хвилі.

Таблиця 1

Характеристики лазерів, що випромінюють червоне світло

Тип лазера	Активне середовище	Довжина хвилі, λ , нм	Тривалість імпульсу, τ	Частота повторення, ν , Гц	Потужність, P , Вт	Енергія імпульсу, W , Дж
Безперервний	He-Ne	632,8			$(1-50) \cdot 10^{-3}$	
Імпульсний	Рубін	694	1 мс	$10^{-3}-1$	10^5-10^6	10^2-10^3
Імпульсний*	Рубін	694	20 нс	1	10^6-10^9	0,02–20

* – режим отримання коротких імпульсів.

У сучасних біофізичних дослідженнях використовуються ще більш короткі імпульси: від пікосекунд (10^{-12} с) до фемтосекунд (10^{-15} с).

Лазерні джерела випромінювання успішно використовуються для спостереження явища дифракції.

Дифракцією світла називають явище огинання світлом малих перешкод, що супроводжується проникненням хвилі світла в область тіні.

Дифракцію можна спостерігати, наприклад, при проходженні світла через систему щілин, розташованих на деякій відстані одна від одної, – дифракційну ґратку (рис. 1).

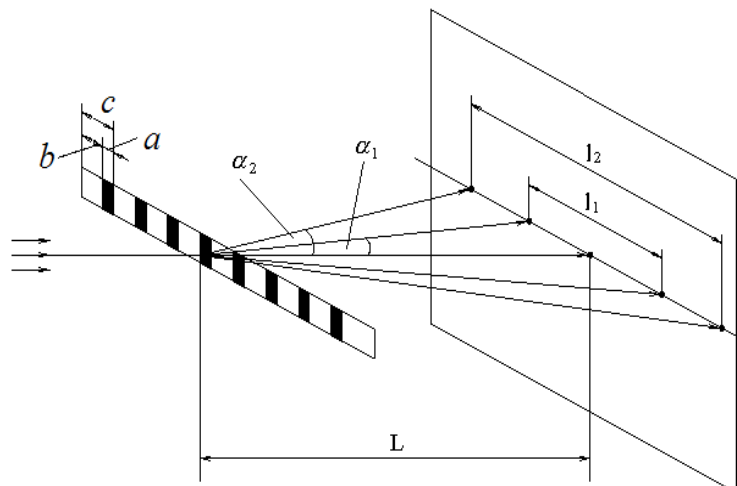


Рис. 1. Дифракційна картина на системі щілин та її геометрія

Ширина щілин a і відстань b між ними визначають період ґратки $c=a+b$. При нормальному падінні монохроматичної хвилі розподіл інтенсивності світла за ґраткою описується формулою:

$$I(\alpha) = I_0 \left(\frac{\frac{\sin \frac{\pi a \sin \alpha}{\lambda} \sin \frac{\pi N c \sin \alpha}{\lambda}}{\frac{\pi a \sin \alpha}{\lambda} \sin \frac{\pi c \sin \alpha}{\lambda}} \right)^2, \quad (1)$$

де I_0 – інтенсивність падаючого світла, λ – довжина хвилі, N – кількість освітлених щілин дифракційної ґратки.

Коли кути задовольняють умові:

$$c \sin \alpha_n = \pm n \lambda, \quad \text{де } n = 0, 1, 2, \dots, \quad (2)$$

функція $I(\alpha)$ приймає максимальні значення, які називаються головними максимумами. Вони розташовані симетрично щодо центрального максимуму. Між ними розташовуються $N-2$ додаткових максимумів, інтенсивність яких значно менша (див. рис. 1).

Дифракцію можна спостерігати і при падінні світла на одинокий об'єкт, наприклад, сферу. У цьому випадку картина має вигляд оточуючих світле центральне коло концентричних темних і світлих кілець, які чергуються (рис. 2).

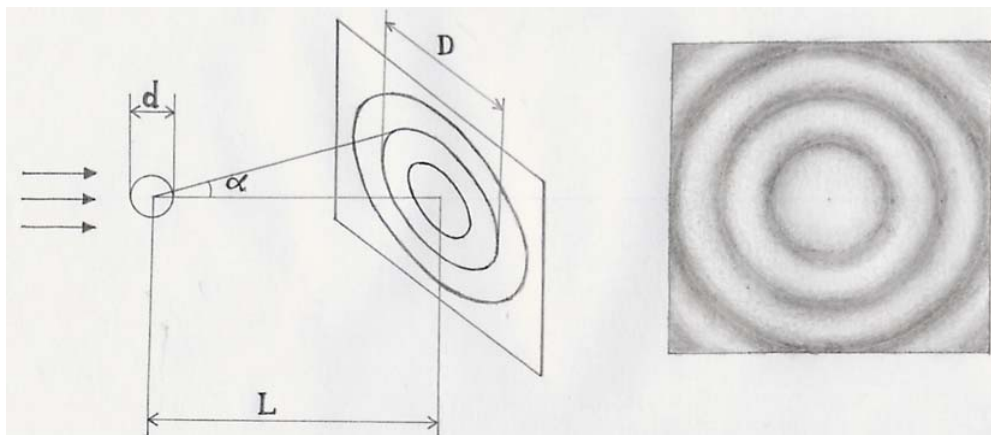


Рис. 2. Дифракційна картина на сферичній поверхні та її геометрія

Перші кілька темних і світлих кілець (мінімуми і максимуми інтенсивності випромінювання) спостерігаються при наступних кутах розсіювання світла:

$$\begin{aligned} \sin \alpha_1 &= p_1 \frac{\lambda}{d} - \text{мінімум}, & \sin \alpha_2 &= p_2 \frac{\lambda}{d} - \text{максимум}, \\ \sin \alpha_3 &= p_3 \frac{\lambda}{d} - \text{мінімум}, & \sin \alpha_4 &= p_4 \frac{\lambda}{d} - \text{максимум}, \\ \sin \alpha_5 &= p_5 \frac{\lambda}{d} - \text{мінімум}. \end{aligned}$$

У цих формулах d – діаметр сфери, $p_1 = 1,22$, $p_2 = 1,64$, $p_3 = 2,22$, $p_4 = 2,68$, $p_5 = 3,24$ – корені функції Бесселя першого порядку.

Така ж дифракційна картина спостерігається і при освітленні шару малих круглих частинок однакового розміру, розміщених хаотично.

Вимірявши кути α_n , можна визначити діаметр частинок за наступною формулою:

$$d = \frac{p_n \lambda}{\sin \alpha_n}, \quad \text{де } n = 1, 2, 3, \dots \quad (3)$$

Всі деталі **експериментальної установки** розташовуються на оптичній лаві 1 (рис. 3). Джерелом світла слугує лазер 2. Його промінь потрапляє на об'єкт дослідження, укріплений у тримачі 3. Дифракційна картина спостерігається на екрані 4.

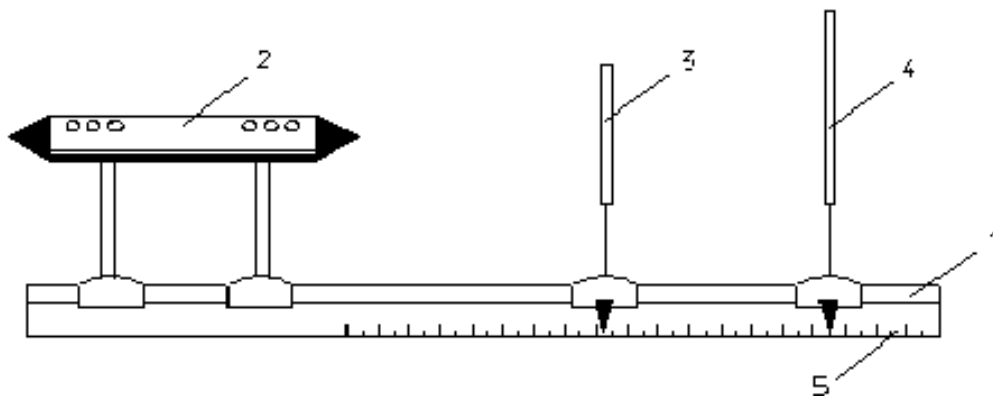


Рис. 3. Установка для спостереження дифракційної картини

Щоб визначити довжину хвилі випромінювання лазера, необхідно знати період дифракційної ґратки c , порядок максимуму n і кут α_n . Період ґратки вказаний на її оправі.

Кут α_n можна знайти за формулою, попередньо здійснивши геометричні виміри:

$$\operatorname{tg} \alpha_n = \frac{l_n}{2L}, \quad (4)$$

де L – відстань між ґраткою і екраном, l_n – відстань між максимумами одного порядку, розташованими симетрично щодо центрального максимуму. Довжина хвилі, згідно з формулою (2), дорівнює:

$$\lambda = \frac{c \sin \alpha_n}{n}. \quad (5)$$

Для визначення розмірів сферичних частинок використовується препарат еритроцитів крові. Діаметр еритроцитів обчислюється за формулою (3). Кут α_n знаходиться із співвідношення:

$$\operatorname{tg} \alpha_n = \frac{D_n}{2L}, \quad (6)$$

де D_n – діаметр дифракційного кільця, L – відстань між препаратом і екраном (рис. 2). Оскільки дифракційні кільця на екрані зображаються широкими, то

$$D_n = \frac{D_{\min} + D_{\max}}{2}, \quad (7)$$

де $D_{\min}$ і $D_{\max}$ – внутрішній і зовнішній діаметри кільця.

Значення коефіцієнтів p_n беруться відповідно номеру кільця, які нумеруються, починаючи з першого темного кільця, що оточує центральне світле коло.

Виконання роботи

Лабораторне обладнання та матеріали: оптична лава, лазер, утримувачі, лінійка, дифракційна ґратка, препарат еритроцитів крові, предметні стекла, скляні палички.

Увага! Вмикати і налаштовувати лазер дозволяється тільки в присутності викладача або інженера! Будь-яке переміщення лазера як у ввімкненому, так і у вимкненому стані студентам категорично забороняється. **Потрапляння в очі прямого лазерного випромінювання небезпечно для зору.**

Завдання 1. Визначення довжини хвилі випромінювання лазера.

1. Розташуйте в тримачі 3 дифракційну ґратку. Налаштуйте відстань між ґраткою та екраном так, щоб на екрані 4 спостерігалась дифракційна картина.

2. Виміряйте відстань L між ґраткою і екраном. Виміряйте відстань l_1 між максимумами першого порядку. Проведіть аналогічні вимірювання відстаней l_n для максимумів другого і третього порядків.

3. Визначте кути α_n за формулою (4). За формулою (5) обчисліть довжину хвилі випромінювання λ для кожного кута α_n . Обчисліть середню довжину хвилі випромінювання лазера $\bar{\lambda}$. Здійсніть статистичну обробку даних (див. лабораторну роботу № 1).

4. Результати вимірювань і обчислень занесіть у таблицю.

n	L , мм	l_n , мм	α_n , град	λ , мкм	$\bar{\lambda}$, мкм	σ	$\bar{\lambda} \pm \Delta x_{0,95}$

Завдання 2. Визначення розмірів еритроцитів.

1. Приготуйте препарат еритроцитів у вигляді мазка на предметному склі. Для цього потрібно скляною паличкою нанести краплю крові на предметне скло і розподілити її по склу тонким шаром.
2. Розташуйте в тримачі 3 препарат еритроцитів.
3. Налаштуйте відстань L між препаратом і екраном 4, переміщаючи екран уздовж оптичної лави, так, щоб на екрані спостерігалася чітка дифракційна картина.
4. Виміряйте відстань L між препаратом і екраном.
5. Виміряйте внутрішній $D_{\min}$ і зовнішній $D_{\max}$ діаметри першого темного кільця. Зробіть такі ж вимірювання для наступних світлих і темних кілець. Обчисліть за формулою (7) середні діаметри D_n для кожного кільця.
6. За формулою (6) визначте кути дифракції α_n .
7. Користуючись виразом (3), обчисліть діаметр еритроцитів d для кожного кута α_n .
8. Обчисліть середній діаметр $\bar{d}$.
9. Результати вимірювань і обчислень занесіть у таблицю.

n	p_n	L , мм	$D_{\min}$, мм	$D_{\max}$, мм	D_n , мм	α_n , град	d , мкм	$\bar{d}$, мкм	σ	$\bar{d} \pm \Delta x_{0,95}$

Завдання 3. Зробити висновки.

Завдання 4. Розв'язати задачі.

1. На дифракційній ґратці отримана дифракційна картина монохроматичного променя. Встановлено, що максимуму другого порядку відповідає кут відхилення променів $\alpha=19^\circ$. Дифракційна ґратка містить $n=250$ штрихів на 1 мм. Визначте довжину хвилі монохроматичного світла.
2. Яка буде енергія W лазерного імпульсу, щоб при маніпуляції приварювання ділянки сітківки ока, яка відшарувалася, нагріти її ділянку об'ємом $V=1 \text{ мм}^3$ від температури тіла $t_T=37^\circ\text{C}$ до температури коагуляції $t_K=90^\circ\text{C}$? Яка потужність лазерного випромінювання в імпульсі, якщо його тривалість $\tau=1 \text{ мс}$? Прийняти теплоємність тканини $C=4200 \text{ Дж/кг}\cdot\text{град}$, щільність тканини $\rho=1000 \text{ кг/м}^3$, частка поглиненої енергії імпульсу $\eta=30\%$.

Завдання 5. Виконати тестові завдання.

1. Дайте визначення дифракції світла:
 - а) проходження світлом малих перешкод;
 - б) поглинання світла малими перешкодами;
 - в) огинання світлом малих перешкод, що супроводжується проникненням хвилі світла в область тіні.

2. Як виглядає картина дифракції світла на сфері?

- a) чергуються темні та світлі смуги;
- b) чергуються концентричні темні та світлі кільця;
- c) чергуються темні концентричні кільця та світлі смуги;
- d) чергуються світлі концентричні кільця та темні смуги.

3. Довжина хвилі випромінювання за методом дифракції світла на дифракційній ґратці оцінюється за формулою:

- a) $\lambda = \frac{\sin \alpha_n}{n}$;
- b) $d = \frac{p_n \lambda}{\sin \alpha_n}$;
- c) $d = \frac{\lambda}{p_n \sin \alpha_n}$;
- d) $d = \frac{\sin \alpha_n}{p_n \lambda}$.

4. Діаметр частинки за методом дифракції світла на сферичній поверхні визначається за формулою:

- a) $d = \frac{\sin \alpha_n}{n}$;
- b) $\lambda = \frac{n \sin \alpha_n}{c}$;
- c) $\lambda = \frac{c \sin \alpha_n}{n}$;
- d) $\lambda = \frac{\cos \alpha_n}{n}$.

5. Визначте умови максимуму дифракції:

- a) $c \cos \alpha_n = (2k+1) \frac{\lambda}{2}$;
- b) $a \sin \alpha_n = (2k+1) \frac{\lambda}{2}$;
- c) $c \sin \alpha_n = \pm n \frac{\lambda}{2}$;
- d) $c \sin \alpha_n = (2k+1) \frac{\lambda}{2}$.

6. Визначте умови мінімуму дифракції:

- a) $a \sin \alpha_n = (2k+1) \frac{\lambda}{2}$;
- b) $a \cos \alpha_n = \pm 2k \frac{\lambda}{2}$;
- c) $a \cos \alpha_n = \pm 2k \frac{\lambda}{2}$;
- d) $c \cos \alpha_n = (2k+1) \frac{\lambda}{2}$.

Контрольні питання

1. Що таке дифракція світла?
2. Дайте визначення дифракційної ґратки.
3. Як виглядає розподіл інтенсивності світла після його проходження через дифракційну ґратку?
4. Як за допомогою дифракційної ґратки виміряти довжину хвилі випромінювання?
5. Як виглядає картина дифракції світла на сфері?
6. Як визначити розміри сфери?
7. Навіщо потрібні значення коренів функції Бесселя в цій роботі?

Рекомендована література

1. Чалий О. В., Цехмістер Я. В., Агапов В. Т., Меленевська А. В., Мурашко М. Л., Радченко Н. Ф., Стучинська Н. В. Медична і біологічна фізика. Київ : Книга плюс, 2004. 760 с.
2. Хвильова оптика. Частина 2. Дифракція і поляризація світла [Електронний ресурс] : підручник для студентів / уклад. В. Г. Колобродов. Київ : НТУУ «КПІ ім. І. Сікорського», 2018. 220 с.
3. Терещенко М. Ф., Тимчик Г. С., Яковенко І. О. Біофізика : підручник. Київ : Політехніка, 2019. 444 с.
4. Compton R. N., Duncan M. A. Diffraction of Light from Blood Cells. In: Compton R. N., Duncan M. A. Laser Experiments for Chemistry and Physics. Oxford University Press. 2016. P. 379–387.
5. Дідух В. Д., Рудяк Ю. А., Багрій-Заяць О. А. Біологічна фізика з фізичними методами аналізу : навч. пос. Тернопіль, 2021. 305 с.

Лабораторна робота № 9



ДОСЛІДЖЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЙНОЇ ТА ТЕМПЕРАТУРНОЇ ЗАЛЕЖНОСТЕЙ МЕМБРАННОГО ПОТЕНЦІАЛУ

Мета роботи: отримання концентраційних і часових залежностей мембранного потенціалу в модельних умовах.

Підготовка до роботи. Повторити наступні питання:

1. Поняття мембранного потенціалу. Рівноважний мембранний потенціал.
2. Механізм генерації мембранного потенціалу в модельній системі і в біологічній клітині.

Мембранним потенціалом називається різниця потенціалів між внутрішньою (цитоплазматичною) і зовнішньою поверхнями мембрани:

$$\Delta\varphi = \varphi_{in} - \varphi_{out}. \quad (1)$$

У плазматичній мембрані з обох боків підтримується різниця потенціалів. Однією з причин встановлення і підтримки різниці потенціалів є наявність градієнтів концентрацій іонів. Градієнт концентрацій на мембрані утворюється в результаті різної проникності мембрани для тих чи інших іонів.

Умовою встановлення рівноваги між двома розчинами, розділеними напівпроникною мембраною, що містять один тип іонів (наприклад, K^+), які нерівномірно розподілені по обидва боки мембрани, є рівність електрохімічних потенціалів по одну та іншу сторону мембрани:

$$RT \ln C_{in} + zF \varphi_{in} = RT \ln C_{out} + zF \varphi_{out}, \quad (2)$$

де C_{in} (C_{out}) та φ_{in} (φ_{out}) – відповідно концентрації іонів і електричні потенціали з внутрішньої (зовнішньої) сторони; R – універсальна газова стала; T – температура; F – стала Фарадея; z – заряд іона.

Враховуючи рівняння (1–2), процес генерації рівноважного потенціалу на мембрані, яка є проникною тільки для одного типу іонів, можна описати за допомогою *рівняння Нернста*:

$$\Delta\varphi = \varphi_{in} - \varphi_{out} = \frac{RT}{zF} \ln \frac{C_{out}}{C_{in}}. \quad (3)$$

Рівняння Нернста показує, що в умовах електрохімічної рівноваги різниця потенціалів на мембрані визначається співвідношенням концентрацій даного іона по обидва боки мембрани.

Якщо мембранний потенціал зумовлений переносом іонів K^+ , при цьому $[K^+]_{in} > [K^+]_{out}$ та $z=+1$, то рівноважний мембранний потенціал буде дорівнювати:

$$\Delta\varphi_{K^+} = \frac{RT}{F} \ln \frac{[K^+]_{out}}{[K^+]_{in}} \leq 0. \quad (4)$$

Для іонів Na^+ , за умови $[Na^+]_{in} < [Na^+]_{out}$ та $z=+1$, рівноважний мембранний потенціал буде дорівнювати:

$$\Delta\varphi_{Na^+} = \frac{RT}{F} \ln \frac{[Na^+]_{out}}{[Na^+]_{in}} \geq 0. \quad (5)$$

На клітинній мембрані завжди існує різниця потенціалів, тобто електричний потенціал всередині клітини відрізняється від зовнішнього. Ця різниця потенціалів називається потенціалом спокою. Якщо зовнішній потенціал прийняти рівним нулю, то внутрішній складе від -50 до -90 мВ, залежно від виду клітин. Причиною виникнення потенціалу спокою є наявність градієнта концентрацій іонів K^+ , Na^+ , Cl^- на клітинній мембрані. Якщо клітинна мембрана проникна тільки для іонів одного типу, наприклад, калію, тоді потенціал спокою буде визначатися рівноважним калієвим потенціалом і описуватися *рівнянням Нернста*. Але на клітинній мембрані внесок у формування потенціалу спокою роблять, як правило, потоки всіх іонів, коефіцієнт проникності яких відмінний від нуля. У такому випадку враховуються тільки іони K^+ , Na^+ , Cl^- . Залежність потенціалу спокою від концентрації і коефіцієнта проникності іонів буде описуватися рівнянням Гольдмана–Ходжкіна–Катца:

$$\Delta\varphi = -\frac{RT}{F} \ln \frac{P_K[K^+]_{in} + P_{Na}[Na^+]_{in} + P_{Cl}[Cl^-]_{out}}{P_K[K^+]_{out} + P_{Na}[Na^+]_{out} + P_{Cl}[Cl^-]_{in}}, \quad (6)$$

де P_K , P_{Na} , P_{Cl} – коефіцієнти мембранної проникності для іонів K^+ , Na^+ , Cl^- , відповідно.

У стані спокою проникності біомембрани для іонів K^+ , Na^+ , Cl^- становить, відповідно, $P_K:P_{Na}:P_{Cl}=1:0,04:0,45$. Оскільки у стані спокою проникність для іонів калію набагато більше проникності для інших іонів, то потенціал спокою визначається переважно різницею концентрацій іонів калію.

Підтримання різниці концентрацій іонів здійснюється за допомогою роботи іонних насосів, що використовують енергію АТФ. K^+/Na^+ -насос, крім того, сприяє збільшенню трансмембранного потенціалу, оскільки виводить три іони натрію і закачує в клітку тільки два іони калію, що збільшує позитивний заряд міжклітинного середовища, а отже, збільшує потенціал спокою.

Збільшення трансмембранної різниці потенціалів називається *гіперполяризацією*, зменшення – *деполяризацією*.

За умов дії на клітину будь-якого подразника її трансмембранний потенціал змінюється, виникає так званий **потенціал дії**. Причиною такого коливання потенціалу спокою є зміна проникності мембрани для іонів натрію, що, в свою чергу, викликано відкриттям натрієвих іонних каналів. У стані збудження коефіцієнти проникності для іонів калію і натрію співвідносяться як $P_K:P_{Na}=1:20$. В результаті інтенсивність потоку іонів натрію в клітину починає перевищувати інтенсивність потоку іонів калію з клітини. Якщо в стані спокою потенціал на мембрані близький до рівноважного калієвого потенціалу, то в стані збудження він наближений до рівноважного натрієвого потенціалу, але не досягає його, оскільки провідності для іонів калію і хлору не рівні нулю.

У клітині відбувається деполяризація мембрани: негативний потенціал клітини наближається до нуля, а потім і зовсім змінюється на протилежний. Такий процес називається реверсією мембранного потенціалу. Максимальне значення потенціалу дії становить, зазвичай, 30÷40 мВ. Збільшення натрієвої провідності триває долі секунд. Далі вона починає знижуватися, а калієва зростає, в результаті чого в клітині відновлюється потенціал спокою. Цей процес називається *реполяризацією* клітинної мембрани.

Виконання роботи

Лабораторне обладнання та матеріали: цифровий вольтметр, іоноселективні електроди (вимірювальний з насиченим розчином KCl електрод порівняння), тонкий листовий целофан, хімічна склянка (100 мл), хімічні склянки (50 мл) – 5 шт., мірний циліндр (50 мл), насичений розчин KCl, розчин KCl невідомої концентрації, магнітна мішалка з підігрівом, термометр, штатив, фіксатор електродів, фільтрувальний папір.

Завдання 1. Отримання концентраційної залежності мембранного потенціалу.

1. Приготувати 5 склянок і мірний циліндр. Набрати 50 мл насиченого розчину KCl у склянку №1 (розчин максимальної концентрації). У решту (чотири) склянок приготувати розведення першого розчину в 10, 100, 1000 і 10000 разів у кількості по ~50 мл кожного (такі розведення можна отримати, послідовно розбавляючи в 10 разів кожен попередній розчин, починаючи з насиченого). Таким чином, отримаємо набір розчинів з концентрацією, яка зменшується.

2. Увімкнути вольтметр і дати йому прогрітися 5 хв. Помістити електроди у склянку з найменшою концентрацією KCl і відрегулювати електроди по висоті так, щоб обидва були занурені в розчин (вимірювальний електрод повинен занурюватися в розчин на 3–5 мм). Вимірювати

мембранний потенціал в мілівольтах через 5 хв, коли показання вольтметра стануть стабільними (встановиться рівноважне значення мембранного потенціалу).

1. Провести вимірювання потенціалу в інших склянках, зберігаючи послідовність від менших концентрацій до більших.

2. Виміряти мембранний потенціал для розчину з невідомою концентрацією KCl, результати вимірювань занести в таблицю.

№ склянки	1	2	3	4	5	x
C, M						
U, мВ						

3. Побудувати графік залежності $U=f(\lg C)^*$ і, користуючись отриманим графіком, визначити концентрацію KCl в останньому розчині.

**Концентрацію вихідного (насиченого) розчину можна обчислити, якщо знати розчинність досліджуваної речовини, для KCl вона становить 255 г/л при температурі 20°C. Концентрацію виразити в моль/л (M).*

Завдання 2. Визначення зміни мембранного потенціалу з часом за умов кімнатної температури.

1. Увімкнути рН-метр в режимі вимірювання напруги і залишити для прогрівання на 5–10 хв.

2. Налити в хімічну склянку 70 мл дистильованої води і занурити в неї електроди так, щоб мембрана вимірювального електрода виявилася зануреною у воду на глибину 3–5 мм.

3. Через 5 хв. записати показання приладу (в мілівольтах) і надалі здійснювати вимірювання потенціалу через кожні 4 хвилини протягом 40 хв.

4. Результати вимірювань занести в таблицю. За отриманими результатами побудувати залежність мембранного потенціалу від часу.

Час, хв.	5	9	13	17	21	25	29	33	37	41
U, мВ										

Завдання 3. Визначення температурної залежності мембранного потенціалу.

1. Замінити дистильовану воду в склянці і помістити в неї мішалку.

2. Поставити склянку на платформу магнітної мішалки. 1.

Увімкнути магнітну мішалку, задаючи мінімальну кількість обертів.

3. Помістити електроди і термометр у воду, відзначити температуру води і величину мембранного потенціалу.

4. Увімкнути підігрів і стежити за показаннями термометра. Записувати значення з вольтметра при підвищенні температури на кожний 1 °C, до тих пір, поки температура не досягне 40 °C.

5. Результати вимірювань занести в таблицю. За отриманими результатами побудувати графік залежності $U = f(T)$.

$T, ^\circ\text{C}$										
$U, \text{мВ}$										

Завдання 4. Зробити висновки.

Завдання 5. Розв'язати задачі.

1. Розрахувати рівноважний мембранний потенціал $\Delta\varphi$, який створюється іонами калію, якщо внутрішньоклітинна концентрація $C_{in} = 500$ ммоль / л, позаклітинна – $C_{out} = 10$ ммоль / л. Температура $T = 27^\circ\text{C}$.

2. У скільки разів внутрішньоклітинна концентрація іонів калію повинна перевищувати зовнішню, щоб потенціал спокою становив $\Delta\varphi = -91$ мВ, температура $T = 37^\circ\text{C}$?

3. У спокої проникність мембрани для іонів натрію і калію знаходиться у співвідношенні $P_K:P_{Na}=1:0,04$, при збудженні – $P_K:P_{Na}=1:20$. Внутрішньоклітинна концентрація іонів калію становить $C_{in} = 550$ ммоль / л, позаклітинна – у 50 разів менше; внутрішньоклітинна концентрація іонів натрію $C_{in} = 50$ ммоль / л, а позаклітинна – у 10 разів вище. Визначити рівноважний потенціал $\Delta\varphi_K$ та $\Delta\varphi_{Na}$ для кожного з цих іонів, величину потенціалу спокою $\Delta\varphi_n$ і потенціалу дії $\Delta\varphi_{dii}$. Температура клітини $T = 27^\circ\text{C}$.

4. Напівпроникна мембрана розділяє два розчини одновалентних іонів концентрацією 50 і 500 ммоль / л. Визначити різницю потенціалів, яка встановлюється на мембрані при температурі 37°C .

5. Фермент Na^+/K^+ -АТФаза в клітинній мембрані здійснив шість циклів. Яку кількість іонів натрію і калію при цьому було активно транспортовано? Яка кількість енергії при цьому була витрачена, якщо гідроліз одного моля АТФ супроводжується звільненням 33,6 кДж?

Завдання 6. Виконати тестові завдання.

1. Чим мембранний потенціал на напівпроникній мембрані відрізняється від потенціалу спокою живої клітини:

- а) не існує відмінностей між даними видами потенціалів;
- б) особливостями транспортних систем, які формують і підтримують потенціали на мембранах;
- в) типами іонів, що беруть участь у формуванні потенціалу на мембрані?

2. Внутрішньоклітинне середовище заряджене в порівнянні з позаклітинним:

- а) у стані спокої – позитивно, на максимумі потенціалу дії – негативно;

- b) у стані спокої – негативно, на максимумі потенціалу дії – позитивно;
- c) завжди позитивно;
- d) завжди негативно.

3. Проникність мембрани для іонів натрію в стані спокою:

- a) більше проникності для іонів калію;
- b) менше проникності для іонів калію;
- c) іони натрію не проникні для мембрани в стані спокою;
- d) порівнянна з проникністю для іонів калію.

4. Як співвідносяться проникності клітинної мембрани для різних іонів у спокої:

- a) $P_K:P_{Na}:P_{Cl}=0,5:0,04:0,45$;
- b) $P_K:P_{Na}:P_{Cl}=1:0,4:0,5$;
- c) $P_K:P_{Na}:P_{Cl}=1:20:0,45$;
- d) $P_K:P_{Na}:P_{Cl}=1:0,04:0,45$?

5. Під час генерації потенціалу дії проникність мембрани для іонів калію:

- a) більше проникності для іонів натрію;
- b) менше проникності для іонів натрію;
- c) іони калію не проникні для мембрани під час генерації потенціалу дії;

d) порівнянна з проникністю для іонів натрію.

6. Як співвідносяться проникності мембрани аксона кальмара для різних іонів при її збудженні:

- a) $P_K:P_{Na}:P_{Cl}=1:0,04:0,45$;
- b) $P_K:P_{Na}:P_{Cl}=1:20:0,45$;
- c) $P_K:P_{Na}:P_{Cl}=1:0,4:0,5$;
- d) $P_K:P_{Na}:P_{Cl}=1:0,04:0,5$?

7. Рівняння Нернста для оцінки мембранного потенціалу:

- a) $\Delta\varphi = \frac{RT}{F} \ln \frac{[C]_{in}}{[C]_{out}}$;
- b) $\Delta\varphi = \frac{F}{RT} \ln \frac{[C]_{in}}{[C]_{out}}$;
- c) $\Delta\varphi = -\frac{RT}{F} \ln \frac{[C]_{out}}{[C]_{in}}$;
- d) $\Delta\varphi = \frac{RT}{F} \ln \frac{[C]_{out}}{[C]_{in}}$.

8. Напівпроникна мембрана розділяє два розчини одновалентних іонів концентрацією 50 і 500 ммоль / л зовні і всередині, відповідно. Визначити різницю потенціалів, яка встановлюється на мембрані при температурі 27°C:

- a) -60 мВ;
- b) 85 мВ;
- c) 105 мВ;
- d) ваш варіант відповіді.

9. Під час генерації потенціалу дії потенціал клітини наближається до рівноважного:

- a) кальцієвого потенціалу;
- b) натрієвого потенціалу;
- c) хлорного потенціалу;
- d) калієвого потенціалу.

10. Який зв'язок між проникністю мембрани для іонів калію і натрію та генерацією потенціалу дії на мембрані:

- a) чим менше проникність мембрани для іонів, тим вище потенціал дії на мембрані;
- b) чим більше проникність мембрани для іонів калію, тим вище потенціал дії на мембрані;
- c) чим більше проникність мембрани для іонів натрію, тим вище потенціал дії на мембрані;
- d) немає зв'язку між двома станами мембрани?

11. Які іони беруть участь у формуванні потенціалу дії на мембрані:

- a) іони калію, натрію, хлору;
- b) іони магнію, кальцію, натрію;
- c) іони кальцію, натрію, хлору;
- d) іони натрію, калію, кальцію?

12. Які види транспорту іонів через мембрану забезпечують формування мембранного потенціалу в клітині:

- a) тільки активний транспорт;
- b) тільки пасивний транспорт;
- c) активний і пасивний транспорт;
- d) дифузійний перенос іонів?

Контрольні питання

1. Дайте визначення потенціалу спокою на мембрані. Які іони підтримують потенціал спокою на мембрані?

2. Які види транспорту іонів через мембрану забезпечують формування потенціалу спокою на мембрані?

3. Рівноважний мембранний потенціал.

4. Формування потенціалу дії на мембрані. Які іони підтримують потенціал дії на мембрані?

5. Які види транспорту іонів через мембрану забезпечують формування потенціалу дії на мембрані?

6. Як співвідносяться проникності біологічної мембрани для різних іонів у стані спокою?
7. Як співвідносяться проникності біологічної мембрани для різних іонів при її збудженні?
8. Рівняння Нернста.
9. Який зв'язок між проникністю біомембрани і генерацією потенціалу дії на мембрані?
10. Чому рівноважний потенціал іонів є електрорушійною силою при формуванні мембранних потенціалів?
11. Чим мембранний потенціал на напівпроникній мембрані відрізняється від потенціалу спокою живої клітини?
12. Чи потребує енергетичних витрат генерація потенціалу дії?

Рекомендована література

1. Костюк П. Г., Зима В. Л., Магура І. С., Мірошніченко М. С., Шуба М. Ф. Біофізика / за ред. П. Г. Костюка. Київ : Обереги, 2001. 544 с.
2. Шуба М. Ф., Давидовська Т. Л., Прилуцький Ю. І., Жолос О. В., Богущька К. І. Електробіофізика. Київ : Фітосоціоцентр, 2002. 152 с.
3. Давидовська Т. Л., Мірошніченко М. С., Прилуцький Ю. І., Жолос О. В. Теоретичні та експериментальні основи біофізики електричних явищ. Київ : Фітосоціоцентр, 2006. 190 с.
4. Шуба Я. М. Основи молекулярної фізіології іонних каналів. Київ : Наук. думка, 2010. 447 с.
5. Юрченко О. І., Бугаєвський О. А., Дрозд А. В., Мельник В. В., Холін Ю. В. Аналітична хімія. Загальні положення. Рівноваги. Якісний та кількісний аналіз : навч. посібник / за ред. О. І. Юрченка. Харків : ХНУ імені В. Н. Каразіна, 2012. 418 с.
6. Handbook of ion channels. Ed. J. Zheng, M. C. Trudeau. CRC Press. 2015. 691 p.
7. Hille B. Ion channels of excitable membranes. 3rd Edition. Sunderland, Massachusetts, USA: Sinauer Associates, 2001. 814 p.

Лабораторна робота № 10



РЕЄСТРАЦІЯ ПОТЕНЦІАЛУ ДІЇ КАРДІОМІОЦИТІВ

Мета роботи: ознайомитися з фізичними основами формування електрокардіограми; вивчити принцип роботи електрокардіографа; отримати практичні навички запису та аналізу електрокардіограми.

Підготовка до роботи. Повторити наступні питання:

1. Поняття електричного диполя. Електричний момент диполя.
2. Особливості будови серця. Електричні структури серця.
3. Поняття потенціалу дії. Механізм генерації потенціалу дії в серцевому м'язі.

Функціонування збудливих тканин, зокрема серцевого м'яза, пов'язане з електричними явищами в них. При порушенні клітин відбувається селективна зміна провідності клітинних мембран для іонів. В результаті цього виникають електричні струми, спрямовані перпендикулярно площині мембрани (формування потенціалу дії), і поздовжні струми, що забезпечують проведення збудження від одного кардіоміоциту до іншого. Збудження клітин провідної системи серця характеризується поширенням хвилі збудження по серцевій стінці, тобто послідовною деполяризацією і реполяризацією клітинних мембран.

Процес поширення збудження по різних частинах серця має складний характер. Основні елементи електричної структури серця – *це клітини водія ритму (пейсмейкernі клітини), спеціалізована провідна тканина та виконавчі м'язові клітини передсердь і шлуночків*. Пейсмейкernі клітини з певною частотою генерують потенціали дії, розвиваючи процес збудження в передсердях. Оскільки передсердя відділені від шлуночків фіброзною тканиною, не здатною проводити збудження, то імпульс збудження передається в область передсердь за допомогою атріовентрикулярної провідної системи. Тканина атріовентрикулярної системи передає збудження досить повільно, тому збудження шлуночків відбувається з деякою затримкою щодо передсердь. У скорочувальному міокарді поширення збудження від клітини до клітини має безперервний характер, переміщаючись від ендокарда до епікарда. Подібна будова тканини міокарда являє собою так званий **функціональний синцитій** і дозволяє з цієї точки зору розглядати серце як одну клітину складної форми.

При збудженні і реполяризації клітин серця виникає електричне поле, яке можна зареєструвати з поверхні тіла. При цьому між різними точками тіла створюється різниця потенціалів, що змінюється відповідно до коливань величини і напрямку електричного поля серця. Метод дослідження роботи

серця, заснований на реєстрації потенціалів електричного поля з поверхні тіла, що змінюються в часі, називається **електрокардіографією**.

Потенціал дії, виникаючи і поширюючись в різних структурах серця, створює в ньому змінне електричне поле, а отже, змінну різницю потенціалів, що реєструється з поверхні тіла. Швидкість поширення збудження в серці змінюється за напрямком і величиною. Це означає, що неможливо зробити повний опис електричного стану серця, математичний опис розподілу мембранних потенціалів по всьому об'єму серця в кожній клітині і опис зміни цих потенціалів у часі.

Коректний опис електричної активності серця є можливим у рамках теорії Ейнтховена. Відповідно до даної теорії серце розглядається як еквівалентний генератор струму (струмовий диполь) і вважається, що струмовий диполь (серце) створює на поверхні тіла електричне поле, яке змінюється зі зміною електричної активності серця.

Основні положення теорії Ейнтховена

1. Серце розглядається як електричний струмовий диполь, що має момент $\vec{E}$. Вектор $\vec{E}$ є векторною сумою дипольних моментів різних мікроділянок серця. Цей результуючий вектор називається інтегральним електричним вектором серця ($\vec{E} = \sum_{i=1}^n \vec{D}_i$).

2. Диполь занурений в однорідне ізотропне електропровідне середовище, якими є тканини організму.

3. Вектор змінюється при роботі серця за величиною і напрямком. Це обумовлено послідовністю поширення збудження в різних відділах серця по стінках правого і лівого шлуночків до його основи.

4. Різниця потенціалів між точками на поверхні тіла (наприклад, правою і лівою рукою) пропорційна проекції вектора на лінію, що сполучає точки знімання.

5. Ліва рука, права рука і ліва нога утворюють так званий трикутник Ейнтховена і є стандартними точками знімання ЕКГ в I, II і III відведеннях.

Фізичні основи методу електрокардіографії

Для розрахунку потенціалів електричного поля, створеного генератором електричного струму в однорідному провідному середовищі, генератор представляють у вигляді токового електричного диполя. Диполь характеризується електричним моментом – це векторна фізична величина, яка чисельно дорівнює добутку модуля заряду на відстань між зарядами і спрямована від негативного заряду до позитивного.

Потенціал, створюваний струмовим генератором, в точці А (рис. 1), віддаленій від зарядів електричного диполя на відстань r і r_1 , дорівнює:

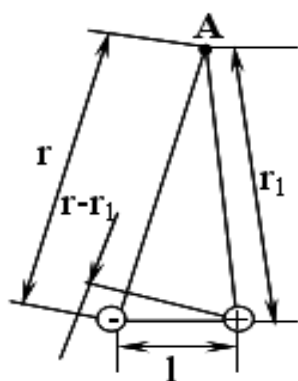


Рис. 1. Потенціал диполя в точці А

$$\varphi = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \frac{\vec{E} \cdot \cos \alpha}{r^2}, \quad (1)$$

де $\vec{E}$ – дипольний момент; ϵ – відносна діелектрична проникність середовища; ϵ_0 – електрична стала.

Різниця потенціалів у двох точках А і В (рис. 2), рівновіддалених від електричного диполя:

$$\varphi_B - \varphi_A = \frac{\sin(\beta/2)}{2\pi\epsilon_0 r^2} E \cdot \cos \gamma \quad (2)$$

З виразу (2) видно, що різниця потенціалів у двох точках поля електричного диполя залежить від синуса половини кута, під яким видно ці точки від диполя, і від проекції електричного моменту диполя на пряму, що сполучає точки.

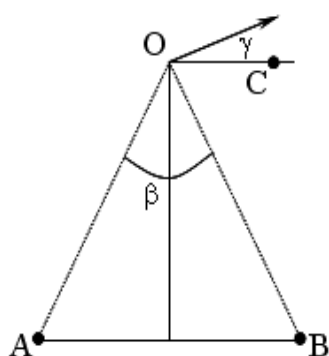


Рис. 2. Потенціал диполя в точці В

Якщо диполь розташувати в центрі рівностороннього трикутника (рис. 3), то пари вершин трикутника будуть видні, щодо диполя, під одним кутом: $\beta_{AB} = \beta_{BC} = \beta_{AC}$. Різниці потенціалів у довколишніх вершинах рівностороннього трикутника відносяться як проекції вектора на його сторони:

$$U_{AB} : U_{BC} : U_{AC} = E_{AB} : E_{BC} : E_{AC} \quad (3)$$

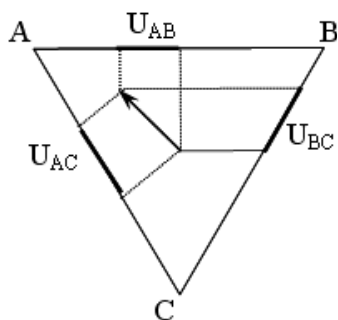


Рис. 3. Диполь в середині рівностороннього трикутника

або

$$U_{AB} : U_{BC} : U_{AC} = E \cos \alpha_{AB} : E \cos \alpha_{BC} : E \cos \alpha_{AC}, \quad (4)$$

де α – кут між диполем і відповідною стороною трикутника. Оскільки E є постійною величиною, вираз (4) можна переписати у вигляді

$$U_{AB} : U_{BC} : U_{AC} = |\cos \alpha_{AB}| : |\cos \alpha_{BC}| : |\cos \alpha_{AC}|. \quad (5)$$

Знаючи напругу, можна визначити, як орієнтований диполь щодо сторін трикутника. З рис. 3 видно, що

$$\alpha_{AC} = \frac{\pi}{3} - \alpha_{AB}, \quad \alpha_{BC} = \frac{2\pi}{3} - \alpha_{AB}. \quad (6)$$

Зі співвідношення (5) слідує, що

$$\begin{aligned} U_{AB} &= k \cos \alpha_{AB} \\ U_{BC} &= k \cos \alpha_{BC}, \\ U_{AC} &= k \cos \alpha_{AC} \end{aligned} \quad (7)$$

де k – коефіцієнт пропорційності, що залежить від властивостей середовища, дипольного моменту і розмірів трикутника.

Використовуючи співвідношення (6) і після виконання тригонометричних перетворень, отримуємо:

$$\operatorname{tg} \alpha_{AB} = \frac{1}{\sqrt{3}} \cdot \frac{U_{AC} + U_{BC}}{U_{AC} - U_{BC}}. \quad (8)$$

У відповідності до теорії Ейнтховена інтегральний електричний вектор серця розташований в центрі рівностороннього трикутника, вершини якого умовно розташовані в правій руці, лівій руці і лівій нозі, так званий трикутник Ейнтховена (рис. 4).

Реєстрація електричних потенціалів серця здійснюється за допомогою електродів. Електрод можна розглядати як пристрій, що відводить потенціал поля, завдяки чому реєстрований в деякій точці поверхні тіла потенціал отримав назву **відведення**. Напруга між двома електродами, розміщеними на поверхні тіла, – **сигнал відведення**, залежить від розташування електродів і вектора серця, від електричних характеристик тіла. Таким чином, сигнал відведення можна трактувати як скалярний добуток вектора серця на вектор відведення, що враховує геометричну структуру та електричну неоднорідність тіла. Найбільш широко застосовуються **стандартні відведення**. Електроди **стандартних відведень, або відведень від кінцівок**, встановлюються на поверхні рук і ніг (на зап'ястях і щиколотках).

В якості нульового електрода, зазвичай, використовують електрод відведення від правої ноги, який заземлюють для того, щоб зменшити випадкові шуми. Підключені попарно до вимірювального приладу відведення від решти кінцівок утворюють систему, що складається з трьох **сигналів відведень** U_1, U_2, U_3 :

$$\begin{aligned} U_1 &= \varphi_{LA} - \varphi_{RA} \\ U_2 &= \varphi_{LL} - \varphi_{RA} \\ U_3 &= \varphi_{LL} - \varphi_{LA} \end{aligned} \quad (9)$$

де індекси RA, LA і LL означають праву руку, ліву руку і ліву ногу відповідно. Напруги відведень U_1, U_2, U_3 можна знайти шляхом проектування вектора серця на відповідний вектор відведення та множення на модуль вектора відведення.

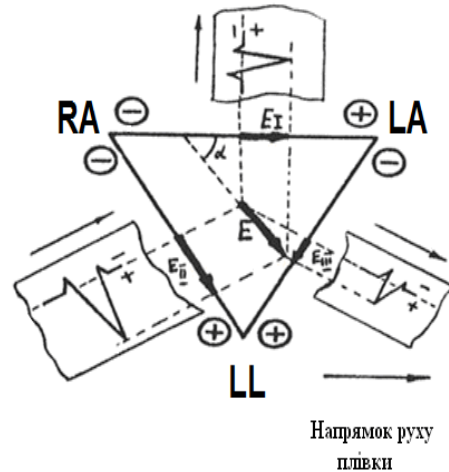


Рис. 4. Трикутник Ейнтховена.
Схема формування зубців ЕКГ у трьох стандартних відведеннях

Повний цикл роботи серця включає в себе збудження передсердь, деполяризацію і реполяризацію шлуночків. Миттєві значення інтегрального електричного вектора серця змінюються як за величиною, так і за напрямком таким чином, що при незмінній точці початку векторів кінці їх описують послідовно три петлі певної конфігурації. Цим трьом петлям в ЕКГ в будь-якому відведенні (в нормі) відповідають три піки **P**, **QRS**, **T**. Для будь-якого обраного моменту часу напрямок і модуль інтегрального електричного вектора серця має певну величину, але проекції цього вектора на три відведення різні (рис. 5).

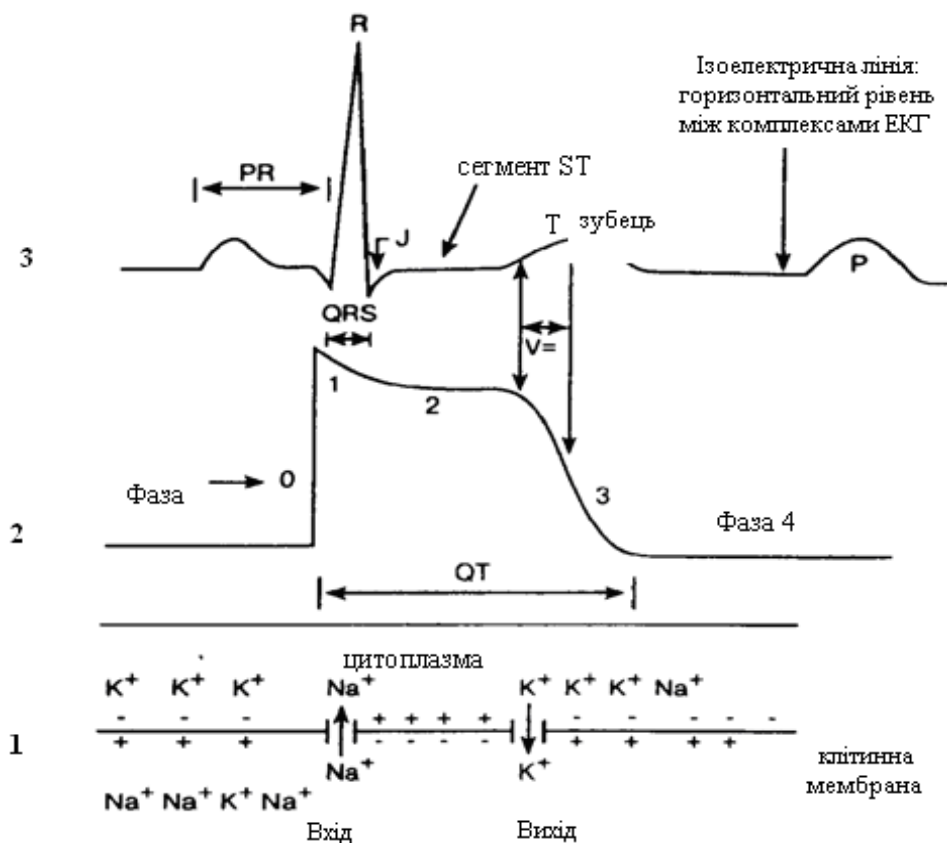


Рис. 5. Схематичне зображення іонного транспорту (1), формування потенціалу дії (2) в структурах серця і відображення цього процесу на електрокардіограмі (3)

Піки ЕКГ називаються **зубцями**. Зубець **P** відповідає деполяризації обох передсердь, комплекс **QRS** відображає деполяризацію шлуночків, а зубець **T** збігається за часом з реполяризацією шлуночків. Основними характеристиками ЕКГ є форма і висота зубців, а також тривалість часових інтервалів між ними. При патологічних змінах у серці відбувається зміна цих характеристик, що дозволяє використовувати електрокардіограми для діагностики захворювань серця. Клінічна діагностика за електрокардіограмою в більшості випадків заснована на оцінці морфології **QRS** комплексу та характеру його повторення в часі для послідовних серцевих циклів.

Тривалість інтервалу **P–R** (від початку зубця **P** до початку комплексу **QRS**) характеризує час проведення збудження між передсерддями і шлуночками. Нульова, або ізопотенціальна, лінія визначається сегментом **T–P** (від кінця зубця **T** до початку зубця **P** наступного серцевого циклу). Сегмент **S–T** в нормальних умовах знаходиться на рівні ізопотенціальної лінії, відхилення від якої також може свідчити про порушення роботи серця.

Інтервал **Q–T** вказує на повну тривалість електричної систоли шлуночків. Частота серцебиття визначається як величина, зворотна тривалості інтервалу **R–R**.

За висотою зубців ЕКГ можна визначити кут α , утворений вектором дипольного моменту серця з лінією відведення 1:

$$\operatorname{tg} \alpha = \frac{1}{\sqrt{3}} \cdot \frac{U_2 + U_3}{U_2 - U_3} \quad (9)$$

Кут α визначає напрямок моментної електричної осі серця. В той момент часу, коли дипольний момент серця приймає максимальне значення (зубець **R** на ЕКГ), напрямок дипольного моменту (електрична вісь серця) збігається з його анатомічною віссю. На підставі цього, використовуючи електрокардіограму, визначають положення анатомічної осі серця. У табл. 1 надані характеристики різних хвиль нормальної ЕКГ і відношення їх до фаз серцевого ритму.

Таблиця 1

Характеристики різних хвиль нормальної ЕКГ
і відповідність їх фазам серцевого ритму

Інтервал ЕКГ	Амплітуда, мВ	Тривалість, с	Відношення до фаз серцевого циклу
P	0,05–0,25	0,008–0,1	Деполаризація передсердь (передуює скороченню передсердь)
P–Q	0,0	0,12–0,02	Поширення деполаризації до атріовентрикулярного вузла (проміжок часу від початку збудження передсердь до початку збудження шлуночків)
Q	0,02	max 0,03	Шлуночковий комплекс QRS – розповсюдження збудження тканиною шлуночків. Q – перше негативне відхилення від ізоелектричної лінії. R – перше позитивне відхилення. S – негативне відхилення після R зубця (передуює скороченню шлуночків)
R	0,3–1,6	max 0,03	
S	0–0,3	max 0,03	
S–T	0,0	0,1–0,25	Повна деполаризація волокон міокарда шлуночків (спорожнення шлуночків)
T	0,1	0,1	Хвиля реполяризації шлуночка. Слід за розслабленням шлуночка
T–P	0,0	0,3	Електрична діастола серця

Опис функціональної схеми електрокардіографа

Функціональна схема одноканального електрокардіографа ЕК1К–01 зображена на рис. 6.

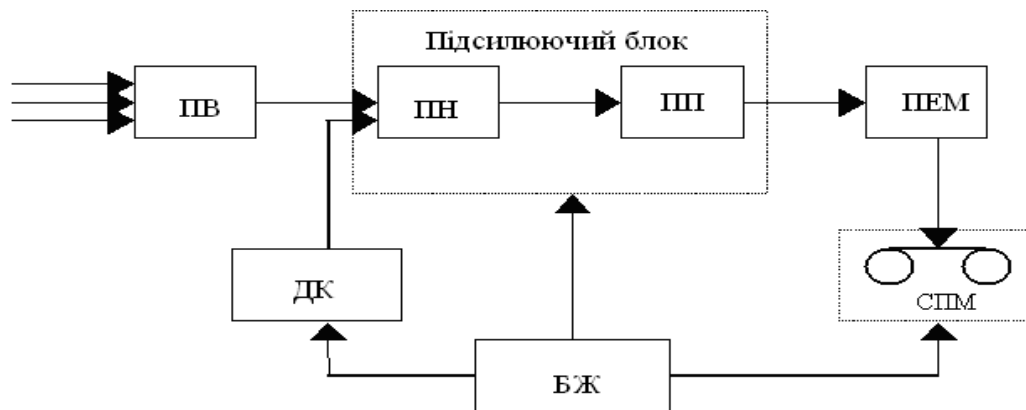


Рис. 6. Блок-схема електрокардіографа

Біоелектричні сигнали через кабель відведень і перемикач відведень (ПВ) подаються на вхід підсилювача напруги (ПН). Посилений сигнал з виходу ПН подається на вхід підсилювача потужності (ПП), після якого сигнал надходить на електромеханічний перетворювач (ПЕМ), керуючий переміщенням пера самописця. Механізм протягування стрічки (СПМ) забезпечує рівномірну швидкість прокрутки діаграмної стрічки. На вхід підсилювача напруги з метою калібрування шкали діаграмної стрічки від джерела калібрувальної напруги (ДК) може бути підключена калібрована напруга. Живлення всіх вузлів електрокардіографа забезпечує відповідний блок (БЖ).

Основні регулювання електрокардіографа:

- вимикач мережі;
- перемикач відведень;
- перемикачі чутливості;
- регулювання зміщення пера самописця;
- перемикач швидкості переміщення діаграмної стрічки;
- кнопка запису.

Виконання роботи

Лабораторне обладнання та матеріали: електроди для кінцівок, електрокардіограф, розчин електроліту, вата.

Завдання 1. Реєстрація електрокардіограми в спокійному стані і після фізичного навантаження.

1. Уважно ознайомтеся з основами роботи на електрокардіографі.
2. Підготувати електрокардіограф до роботи.

Переконайтеся, що вимикач мережі знаходиться в положенні ВИМКНУТО, а гніздо заземлення, розташоване на задній панелі електрокардіографа, підключено до заземлювальної шини.

Проведіть початкові налаштування:

- перемикач відведень встановіть у положення 0;
- перемикач чутливості встановіть у положення 10 мм/мВ;
- перемикач швидкості переміщення діаграмної стрічки встановити в положення 25 мм/с.

Увімкніть електрокардіограф у мережу, встановіть електроди у відповідності зі схемою стандартних відведень і підключіть дроти кабелю відведень до електродів (або до виходу імітатора ЕКГ). Для зняття електрокардіограми по системі стандартних відведень електроди накладаються на внутрішні поверхні передпліч і гомілок пацієнта. Для кращого контакту електродів з поверхнею тіла застосовуються прокладки з марлі, змочені 10 % NaCl. Кабель з'єднується з електродами в наступному порядку: червоний – до електрода на правій руці, жовтий – до електрода на лівій руці, зелений – до електрода на лівій нозі, чорний – до електрода на правій нозі; підключити кабель відведень до гнізда електрокардіографа.

3. Провести запис електрокардіограми в спокійному стані.

Встановіть перо на середину поля запису регулятором зміщення пера. Увімкніть режим калібрування, натисніть перемикач «V». Короткочасно натискаючи кнопку запису, зафіксуйте рівень напруги калібрування на діаграмній стрічці (1 мВ).

Запишіть ЕКГ від трьох стандартних відведень, відповідно змінюючи положення перемикача відведень. Амплітуду ЕКГ в будь-якому з відведень слід контролювати, змінюючи чутливість пристрою.

4. Провести запис електрокардіограми після виконання фізичного навантаження, дотримуючись інструкції п. 3.

Завдання 2. Визначення основних параметрів ЕКГ.

1. Виміряйте для кожного відведення висоту h зубців ЕКГ. Обчисліть різницю потенціалів, яка відповідає кожному зубцю, за формулою $U=h/S$. Результати вимірювань і обчислень ЕКГ до і після виконання фізичного навантаження занесіть в табл. 2 і 3, відповідно.

Таблиця 2

Параметри ЕКГ в спокійному стані

Умовне позначення зубця ЕКГ	h , мм			S , мм/мВ			U , мВ		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
P									
R									
S									
T									

Таблиця 3

Параметри ЕКГ після фізичного навантаження

Умовне позначення зубця ЕКГ	h , мм			S , мм/мВ			U , мВ		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
P									
R									
S									
T									

2. Використовуючи дані табл. 1 і 2, за формулою (9) розрахуйте кути α і α' , відповідно.

3. Виміряйте відстані l між відповідними зубцями і для відомої швидкості V руху стрічки за формулою $t = l / V$ обчисліть тривалість t часових інтервалів ЕКГ до і після фізичного навантаження для відведення 1. Результати занесіть у табл. 4.

Таблиця 4

Тривалість t часових інтервалів ЕКГ до і після фізичного навантаження для відведення 1

Умовне позначення інтервалу	V , мм/с		l , мм		t , с	
	Спокій	Фізичне навантаження	Спокій	Фізичне навантаження	Спокій	Фізичне навантаження
R–R						
P–Q						
Q–R–S						
S–T						
Q–T						

4. За даними табл. 4 визначте частоту пульсу.

Завдання 3. Вивчення впливу перешкод на ЕКГ.

Замініть під електродом правої руки мокру ватку сухою і запишіть ЕКГ. Під час запису пацієнт повинен ледь стискати і розтискати пальці руки. Здійснити опис впливу перешкод на ЕКГ.

Завдання 4. Зробити висновки.**Завдання 5. Розв'язати задачі.**

1. Швидкість пульсової хвилі в артеріях 1,2 мм діаметром становить 10 м/с. Визначити модуль пружності стінки артерії 0,1 мм завтовшки, коли її питома густина дорівнює 1200 кг/м^3 .

2. Визначте різницю фаз $\Delta\varphi$ в пульсовій хвилі між двома точками артерії, розташованими на відстані $\Delta x = 20$ см одна від одної, вважаючи, що швидкість пульсової хвилі становить $v = 10$ м/с, коливання серця гармонічними з частотою $\nu = 1,2$ Гц.

3. Середня швидкість крові в аорті 10 мм діаметром становить 0,4 м/с. У капілярі діаметром 0,008 мм швидкість крові 0,5 мм/с. Через яку кількість капілярів протікає кров?

4. Між двома електродами, до яких прикладена постійна напруга $U = 36$ В, знаходиться жива тканина. Умовно можна вважати, що тканина складається з двох шарів сухої шкіри та м'язів із кровоносними судинами. Товщина кожного шару шкіри $l_1 = 0,3$ мм, товщина внутрішньої тканини $l_2 = 9,4$ мм. Знайдіть щільність струму та падіння напруги в шкірі та в м'язовій (судинній) тканині, розглядаючи їх як провідники. Як змінюється потенціал у напрямку, перпендикулярному до цих шарів?

5. При сухій шкірі опір між долонями рук може досягати значення $R_1 = 10^5$ Ом, а при вологих долонях цей опір суттєво менший ($R_2 = 1000$ Ом). Оцініть струм, який пройде через тіло людини при контакті з електромережею напругою $U = 220$ В. Порівняйте цей струм зі значеннями порогів відчутного струму, що не відпускає, якщо частота струму дорівнює $\nu = 50$ Гц.

Завдання 6. Виконати тестові завдання.

1. При моделюванні ЕКГ вважають, що середовище навколо диполя:

- а) однорідне, анізотропне;
- б) обмежене, анізотропне;
- в) ізотропне, однорідне, нескінченне;
- г) ізотропне, неоднорідне, обмежене;
- д) ваш варіант відповіді.

2. Особливості провідної системи серця:

- а) здатність генерувати тривалий у часі потенціал дії;
- б) здатність кожної клітини серця самостійно генерувати збудження;
- в) однорідність провідної системи по клітинному складу;
- г) здатність тільки пейсмекерних клітин генерувати збудження;
- д) ваш варіант відповіді.

3. Чому амплітуди одних і тих же зубців ЕКГ в один і той же момент часу в різних відведеннях не однакові:

- а) для різних відведень різна величина інтегрального електричного вектора E ;
- б) у різних відведеннях поворот вектора E різний;
- в) проекції вектора E на різні відведення не однакові;
- г) для кожного відведення існує свій вектор E ;
- д) ваш варіант відповіді?

4. Що забезпечує безперервний характер поширення збудження по провідній системі серця:

- а) наявність нервово-м'язових з'єднань;
- б) наявність міжклітинних контактів – нексусів;
- с) однорідність провідної системи по клітинному складу;
- д) здатність кожної клітини самостійно генерувати збудження;
- е) ваш варіант відповіді?

5. Що є причиною змін величини і напрямку інтегрального електричного вектора серця за цикл його роботи:

- а) послідовне охоплення хвилею збудження різних структур серця;
- б) метаболічна активність кардіоміоцитів;
- с) скорочення шлуночків серця;
- д) уповільнення швидкості проведення хвилі в атріовентрикулярному вузлі;
- е) ваш варіант відповіді?

6. Які іони беруть участь у формуванні потенціалу дії кардіоміоцита:

- а) іони калію, натрію, хлору;
- б) іони магнію, кальцію, натрію;
- с) іони кальцію, натрію, хлору;
- д) іони натрію, калію, кальцію;
- е) ваш варіант відповіді?

7. Які іони беруть участь у формуванні потенціалу дії м'язової клітини:

- а) іони калію, натрію, хлору;
- б) іони магнію, кальцію, натрію;
- с) іони кальцію, натрію, хлору;
- д) іони натрію, калію, кальцію;
- е) ваш варіант відповіді?

8. Потоки яких іонів формують фазу плато в потенціалі дії кардіоміоцита:

- а) іонів калію назовні, іонів кальцію всередину;
- б) іонів натрію всередину, іонів калію назовні;
- с) іонів натрію назовні, іонів кальцію всередину;
- д) іонів калію всередину, іонів кальцію назовні;
- е) ваш варіант відповіді?

9. Токовим диполем називається:

- а) генератор з ЕРС ε і внутрішнім опором r ;
- б) ділянка електричного кола, по якому протікає постійний струм;
- с) резистор з малим електричним опором, підключеним до джерела струму;
- д) двополюсна система, що складається з витоку і стоку струму.

10. Модуль дипольного моменту електричного генератора дорівнює:

a) $D = I\varphi$;

b) $D = \frac{I}{\rho}$;

c) $D = Il$;

d) $D = \frac{I}{l}$.

11. Різниця потенціалів, яка створюється диполем у рівновіддалених точках, визначається формулою:

a) $\Delta\varphi = \frac{\varepsilon D}{4\pi r^2} (\cos \alpha_b - \cos \alpha_a)$;

b) $\Delta\varphi = \frac{\varepsilon D}{4\pi r^2} (\sin \alpha_b - \sin \alpha_a)$;

c) $\Delta\varphi = \frac{\varepsilon D}{4\pi \rho} (\cos \alpha_b - \cos \alpha_a)$;

d) $\Delta\varphi = \frac{\rho D}{4\pi r^2} (\cos \alpha_b - \cos \alpha_a)$.

12. Потенціал електричного поля, який створюється одним з полюсів токового диполя в довільній точці простору, дорівнює:

a) $\varphi = \frac{4\pi\varphi I}{r}$;

b) $\varphi = \frac{4\pi r}{\rho I}$;

c) $\varphi = \frac{4\rho}{\pi r}$;

d) $\varphi = \frac{\rho I}{4\pi r}$.

Контрольні питання

1. Дайте визначення потенціалу дії, назвіть його функції в організмі.
2. Графічне зображення потенціалу дії, його основні характеристики.
3. Потенціал дії кардіоміоцита. Робота іонних каналів кардіоміоцита. Які іони беруть участь у формуванні потенціалу дії кардіоміоцита?
4. Перерахувати елементи електричної структури серця.
5. Що забезпечує безперервний характер поширення збудження по провідній системі серця?
6. Основні положення теорії Ейнтховена.
7. Що є причиною змін величини і напряму інтегрального електричного вектора серця за цикл його роботи?

8. Що розуміють під стандартними відведеннями?
9. Чому амплітуди одних і тих же зубців ЕКГ в один і той же момент часу в різних відведеннях не однакові?
10. Що являє собою електрокардіограма і яку інформацію дає аналіз електрокардіограми?
11. Дати опис функціональної блок-схеми електрокардіографа.

Рекомендована література

1. Костюк П. Г., Зима В. Л., Магура І. С., Мірошніченко М. С., Шуба М. Ф. Біофізика / за ред. П. Г. Костюка. Київ : Обереги, 2001. 544 с.
2. Чалий О. В., Цехмістер Я. В., Агапов В. Т., Меленевська А. В., Мурашко М. Л., Радченко Н. Ф., Стучинська Н. В. Медична і біологічна фізика. Київ : Книга плюс, 2004. 760 с.
3. Жарінов О. Й., Куць В. О. Основи електрокардіографії : навч. посіб. Четверте видання, перероблене і доповнене. Київ : Четверта хвиля, 2020. 248 с.
4. Аврунін О. Г., Семенець В. В., Абакумов В. Г., Готра З. Ю., Злепко С. М., Кіпенський А. В., Павлов С. В. Основи реєстрації та аналізу біосигналів : навчальний посібник. Харків : ХНУРЕ, 2019. 400 с.

Лабораторна робота № 11



ВИДІЛЕННЯ СУБКЛІТИННИХ ФРАКЦІЙ МЕТОДОМ ДИФЕРЕНЦІЙНОГО ЦЕНТРИФУГУВАННЯ

Мета роботи: методом диференційного центрифугування отримати плазматичні мембрани еритроцитів.

Підготовка до роботи. Повторити наступні питання:

1. Поняття центробіжне прискорення.
2. Сили, що діють на частинку при седиментації.

Центрифугування – метод препаративного або аналітичного поділу клітинних органел, надмолекулярних структур і біополімерів, заснований на тому, що поведінка зазначених частинок у центробіжному полі визначається їх власними специфічними параметрами – розміром, формою і щільністю.

Центрифугування застосовується для поділу дрібнодисперсних багатокомпонентних сумішей, а також для фракціонування клітинних органел і визначення молекулярної ваги високомолекулярних органічних сполук, наприклад білків, нуклеїнових кислот (седиментаційний аналіз).

Центрифугування буває двох видів: препаративним і аналітичним. Метод препаративного центрифугування використовується для очищення препаратів або для розділення суміші гетерогенних часток з метою їх подальшого дослідження. При аналітичному центрифугуванні за рухом частинок стежать безпосередньо в процесі поділу за допомогою спеціальної вбудованої оптичної системи. Аналіз молекулярної маси, розміру, форми і щільності, таким чином, можна здійснювати безпосередньо в процесі центрифугування.

Поділ речовин за допомогою центрифугування заснований на тому, що у центробіжному полі частинки, що мають різні розміри, форму і щільність, осідають з різною швидкістю.

Принцип методу. При обертанні клітинної суспензії в центрифугу виникає відцентрова сила, що діє на компоненти суспензії, її величина визначається за формулою:

$$F_{\text{ц}} = mr\omega^2, \quad (1)$$

де ω – кутова швидкість ротора; r – відстань між часткою і віссю обертання; m – маса осаджувальної частинки.

Величина відцентрової сили визначається швидкістю обертання ротора і відстанню від осі обертання, добуток цих величин $f_{\text{ц}} = r\omega^2$ є відцентрове прискорення, яке і формує відцентрову силу.

Для порівняння умов центрифугування на різних центрифугах прийнято враховувати **відносне відцентрове прискорення (фактор поділу)**. Фактор поділу Φ_p – це один з основних критеріїв технологічної ефективності роботи центрифуг, який виражається через відношення значення відцентрового прискорення до прискорення вільного падіння – g :

$$\Phi_p = \frac{f_{цб}}{g} = \frac{\omega^2 r}{g} \quad (2)$$

Фактор поділу – безрозмірна величина, що показує, у скільки разів відцентрове прискорення перевищує прискорення вільного падіння, інакше це – відносне відцентрове прискорення. За значенням фактора поділу центрифуги можна умовно поділити на дві групи: нормальні ($\Phi_p < 3500$) і ультрацентрифуги ($\Phi_p > 3500$). Для приблизних розрахунків фактора поділу зазвичай користуються номограмами (рис. 1) або таблицями, які додаються до кожного ротора.

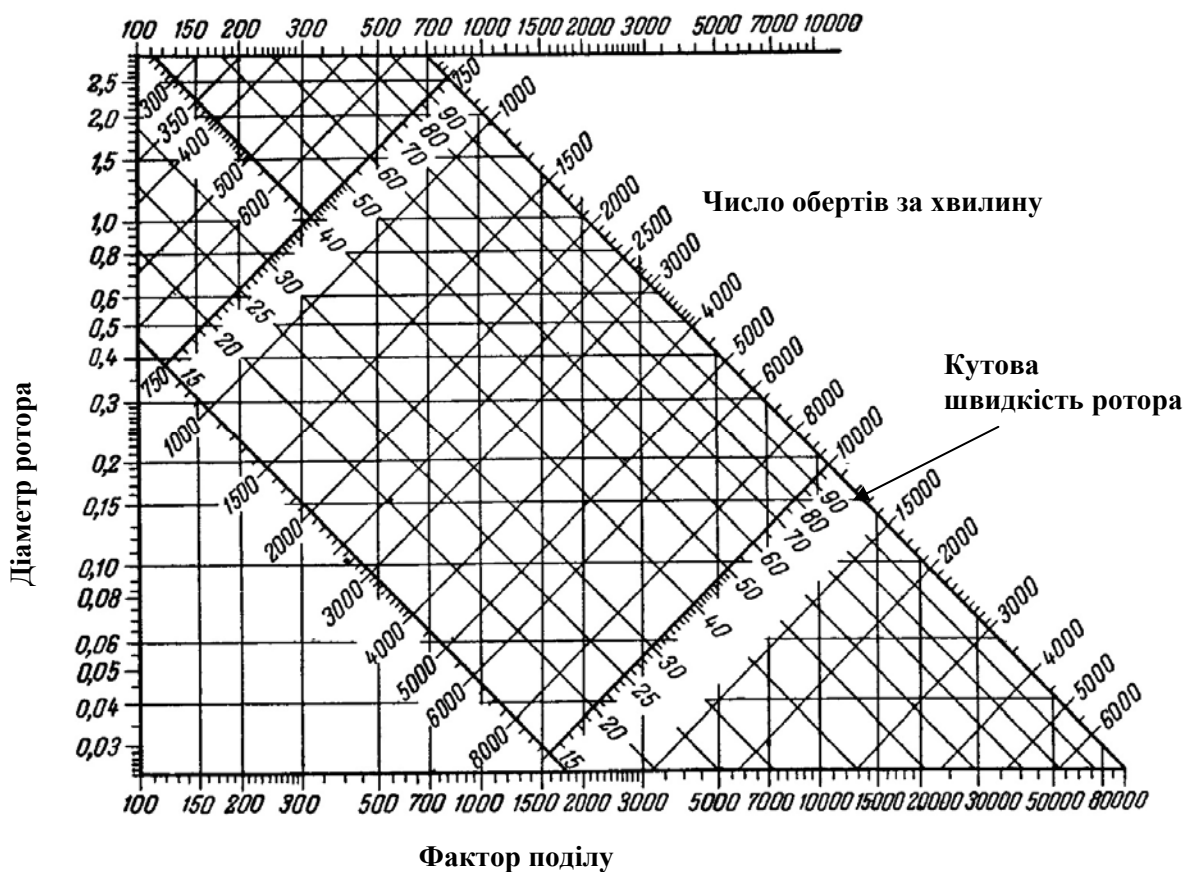


Рис. 1. Номограма для визначення фактора поділу та кутової швидкості ротора в залежності від числа обертів і діаметра ротора центрифуги

Якщо кутову швидкість обертання ротора представити у радіанах, з урахуванням того, що один оберт ротора становить 2π радіан, а n – швидкість обертання ротора, $\text{об} \cdot \text{хв}^{-1}$, то можна записати:

$$\omega = \frac{2\pi \cdot n}{60}. \quad (3)$$

Тоді відцентрове прискорення дорівнюватиме:

$$f_{цб} = \frac{4\pi^2 \cdot n^2 \cdot r}{3600}, \quad (4)$$

а значення відносного відцентрового прискорення розраховується за формулою (5) і дорівнюватиме

$$\Phi_p = \frac{4\pi^2 \cdot n^2 \cdot r}{3600 \cdot g} = 1,118 \cdot 10^{-3} \cdot n^2 \cdot r. \quad (5)$$

Швидкість седиментації – V сферичних частинок залежить не тільки від відцентрового прискорення, але і від щільності і радіуса самих частинок і від в'язкості середовища суспендування. Зазначені фізичні величини частинок та середовища суспендування враховуються з використанням коефіцієнта седиментації – S :

$$V = \omega^2 r S. \quad (6)$$

Коефіцієнт седиментації S залежить від молекулярної маси частинки, парціального об'єму частинки, щільності розчину, коефіцієнта тертя.

Значення коефіцієнта седиментації розраховують за формулою:

$$S = \frac{kD^2(\rho_c - \rho)}{\eta}, \quad (7)$$

де k – коефіцієнт тертя для сферичних частинок дорівнює $1/18$; D – діаметр частинки; ρ_c – щільність частинки; ρ – щільність середовища; η – в'язкість середовища.

Коефіцієнт седиментації не залежить від швидкості обертання і типу ротора. Значення коефіцієнта седиментації виражається в одиницях Сведберга ($1 S = 10^{-13} c$) і характеризує седиментаційні властивості частинок. Величина S може коливатися в широких межах. Чим більше значення S , тим швидше частинки осідають.

З наведених вище міркувань слід зробити **висновки**:

1. Швидкість седиментації (V) пропорційна щільності частинки. Можлива ситуація, коли дрібні, але більш щільні частинки будуть осідати швидше, ніж великі.

2. При однакових щільностях частки більшого розміру осідають швидше, ніж дрібні (у формулу (7) входить D^2).

3. Чим вище в'язкість середовища (η), тим повільніше осідають частинки.

Метод диференційного центрифугування. Метод диференційного центрифугування заснований на відмінностях у швидкостях седиментації частинок, що відрізняються одна від одної розмірами і щільністю. Матеріал, що треба розділити, наприклад гомогенізовані тканини, центрифугують при ступінчатому збільшенні відцентрового прискорення, яке вибирається так, щоб на кожному етапі на дно пробірки осаджувалася певна фракція. В кінці кожної стадії осад відокремлюють від надосадової рідини (супернатанта) і кілька разів промивають, щоб отримати чисту фракцію осаду. Подальше центрифугування супернатанта при наступному збільшенні відцентрового прискорення призводить до седиментації частинок середніх розмірів і щільності, а потім до осадження найдрібніших частинок. Диференційне центрифугування є найпоширенішим методом виділення клітинних органел з гомогенатів тканин. Фракціонування субклітинних компонентів з екстрактів клітин (наприклад, печінки) здійснюється шляхом повторного центрифугування супернатанта при поступово зростаючих швидкостях. У загальному випадку, чим менше за розмірами субклітинний компонент, тим більш висока відцентрова сила потрібна для його осадження.

Умови диференційного центрифугування для розділення клітинних органел:

Компонент	Умови центрифугування	
	Фактор поділу, Φ_p	Час, хв
Клітинні стінки	500-750	10
Ядра	500-1000	10-20
Мітохондрії	9000-18000	10-20
Загальні мікротоми	80000-100000	30-90

Велика дискретність ступенів фактора поділу забезпечує отримання більш чистих препаратів. Однак досягти високого ступеня чистоти практично не вдається через відносно близькі розміри частинок. Для поліпшення очищення використовують центрифугування в градієнтах щільності сахарози, фікола, декстрану та інших речовин.

Способи центрифугування в градієнтах щільності

Макромолекули або органели, які незначно розрізняються за розміром або по щільності, можна розділити центрифугуванням в градієнті щільності. Речовина, що використовується для приготування градієнта, повинна легко розчинятися у воді, бути фізіологічно нешкідливою і хімічно інертною. Її розчин повинен бути нев'язким, прозорим у видимій і УФ областях спектра, а також повинен створювати низький осмотичний тиск. Зазвичай поділ клітинних компонентів проводять у градієнті щільності сахарози. Розчин сахарози відповідає більшості зазначених вище вимог. Градієнти щільності можуть бути безперервними (лінійними) і ступінчатими. Ступінчатий гра-

дієнт кращий у випадку препаративного фракціонування клітин. Він легко готується та забезпечує задовільні умови отримання мембранних фракцій з певним якісним виходом. Для формування ступінчатого градієнта в центрифужну пробірку за допомогою піпетки наносять рівні об'єми розчину носія (сахарози) різної концентрації. При цьому кожний наступний шар є розчином меншої концентрації. Таким чином, найбільш щільний розчин носія розташований біля дна пробірки. Препарат для розділення, як правило, в буферному розчині, наноситься поверх градієнта. Центрифугування з використанням лінійного градієнта щільності передбачає попередню більш складну підготовку носія, при якій концентрація носія повинна лінійно зростати від верху пробірки до її дна.

Для поділу частинок в градієнті щільності використовують два методи: *зональне центрифугування* і *ізопікнічне центрифугування*. При зональному центрифугуванні аналізована проба (наприклад, білки або клітини) наноситься тонким шаром поверх розчину з безперервним градієнтом щільності, що охоплює всі плавучі щільності компонентів досліджуваної суміші. Зразок центрифугують до тих пір, поки частки не розподіляться уздовж градієнта у вигляді дискретних зон. У процесі центрифугування частинки проходять через розчин, тому що їх щільність вище щільності розчину. Швидкість руху залежить від маси і форми частинок. Центрифугування припиняють перш, ніж частинки досягнуть дна центрифужної пробірки. Потім дно проколюють і збирають ряд фракцій, що містять різні частинки. Стабільність градієнта щільності в процесі центрифугування досягається застосуванням розчинів вуглеводів (зазвичай сахарози) або колоїдного силікагелю, концентрація яких зростає від поверхні до дна пробірки. Градієнт щільності перешкоджає утворенню конвекційних потоків, що знижують якість розділення.

В основі ізопікнічного центрифугування лежить поділ частинок в залежності від їх плавучої щільності. Плавуча щільність речовини визначається співвідношенням форми, розмірів і питомої щільності речовин, що розділяються, а також щільністю рідкого компонента.

При ізопікнічному центрифугуванні пробу (наприклад, ДНК, РНК або віруси) рівномірно розподіляють у всьому об'ємі розчину. При цьому способі поділу для створення градієнта розчини сахарози не використовують. Наприклад, нуклеїнові кислоти мають плавучу щільність значно вище, ніж найбільш концентрований розчин сахарози. Найчастіше з цією метою використовують концентровані розчини солей, зазвичай CsCl або Cs₂SO₄, а також солі рубідію. При ізопікнічному центрифугуванні поділ триває значно довше, ніж при зональному. Градієнт щільності створюється в процесі центрифугування за рахунок седиментації і дифузії. З часом кожна частинка потрапляє в область, відповідну до її власної плавучої

щільності. У ході центрифугування легші частинки спливають, у той час як важкі осідають на дно пробірки. Ця особливість використовується, наприклад, при кількісному поділі лізосом, мітохондрій і пероксисом, заснованому на видаленні з гомогенного середовища всіх частинок з більшою, ніж у мікросом, щільністю і наступному ізопікнічному центрифугуванні важких частинок, що випали в осад.

Тіні еритроцитарних мембран. Широке застосування для дослідження структури, властивостей і функціонування біомембран отримали препарати мембран еритроцитів. Еритроцити є порівняно простими клітинами, позбавленими ядра, мітохондрій та інших внутрішньоклітинних включень. У еритроцитів є тільки цитоплазматична мембрана, яка відокремлює цитоплазму від зовнішнього середовища, тому мембранні препарати, отримані з цих клітин, є порівняно однорідними, не забрудненими іншими мембранними елементами. Склад еритроцитарних мембран залежить від методу їх виділення. Існує ряд методів отримання безгемоглобінового препарату «тіней» еритроцитів, що включають на першій стадії лізис клітин за допомогою досить жорстких впливів, таких як діелектричний пробій мембрани, обробка ультразвуком, лізис клітин водою та ін. Потім здійснюють промивку мембран у водно-сольових розчинах різної тонічності. Однак еритроцитарні мембрани відносно просто виділити шляхом осмотичного лізису червоних кров'яних клітин. Виділені мембрани еритроцитів («тіні») зберігають більшість властивостей мембран нативних клітин, зокрема вони здатні відновлювати бар'єрні властивості, що є досить важливим при вивченні транспортних процесів. Під час гіпотонічного гемолізу еритроцитів можна ввести всередину «тіней» різні речовини, дію яких в подальшому досліджувати. Таким чином, однорідність мембранного препарату і легкість його отримання із збереженням нативних властивостей роблять еритроцитарні мембрани зручним об'єктом дослідження. З цієї причини «тіні» широко використовуються в якості природної моделі для вивчення загальних структурно-функціональних характеристик біомембран.

Виконання роботи

Лабораторне обладнання та матеріали: центрифуга, пробірки центрифужні, ваги центрифужні, хімічні склянки, кров донорів з антикоагулянтом, 155 мМ (ізотонічний) розчин NaCl, Na-фосфатний буфер (10 мМ, рН 7.4).

Правила техніки безпеки

Роботи, пов'язані з експлуатацією центрифуг, відносяться до робіт з підвищеною небезпекою. Працюючий на центрифугі повинен дотримуватися послідовності операцій згідно з інструкцією.

При роботі з центрифугою забороняється:

1. Працювати без заземлення.
2. Працювати з відкритою кришкою ротора і центрифуги.
3. Працювати зі скляними пробірками при частоті обертання понад 4000 об/хв.
4. При неповному завантаженні ротора необхідно розміщувати тільки попередньо урівноважені на центрифужних вагах пробірки в гніздах згідно з наведеною на рис. 1 схемою.

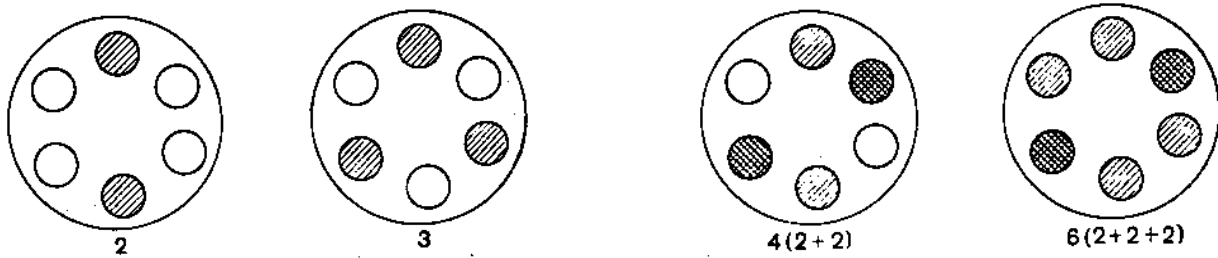


Рис. 1. Розташування 2, 3, 4 і 6 пробірок в шестигніздовому роторі центрифуги

Завдання 1. Виділення еритроцитів донорської крові

Еритроцити виділяють з донорської крові шляхом відділення їх від плазми за допомогою центрифугування.

1. Охолоджену цільну донорську кров вносять у центрифужні пробірки, пробірки попарно врівноважують.

2. Центрифужні пробірки поміщають в охолоджений до 4° С ротор і центрифугують 5 хв при 3000 g (5000 об/хв). Після центрифугування спостерігають у пробірці (рис. 2) верхній жовтий шар – плазма, нижній темний шар – клітини крові еритроцити. На межі цих шарів можна помітити тонкий сіруватий шар – це тромбоцити, а нижче під ними знаходяться лейкоцити.

3. Обережно за допомогою піпетки видаляють плазму і верхній шар лейкоцитів. Еритроцитарну масу, що залишилася, – нижній шар, у співвідношенні 1:1 змішують з охолодженим 155 мМ NaCl. Обережно перемішують отриману суміш, пробірки врівноважують і центрифугують в тих же умовах.

4. Процедуру відмивання еритроцитів у 155 мМ NaCl повторюють тричі, переосаджуючи суспензію при 5000 об/хв протягом 5 хв.

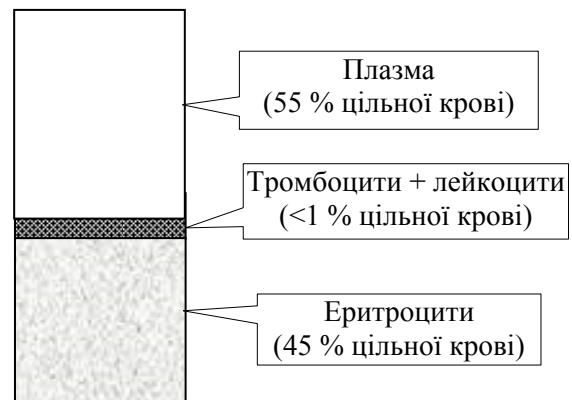


Рис. 2. Поділ крові за фракціями після першого центрифугування

Завдання 2. Виділення еритроцитарних мембран

Цитоплазматичні мембрани еритроцитів отримують за допомогою гіпоосмотичного гемолізу з подальшим їх виділенням за допомогою центрифугування. Для цього:

1. Відмиті еритроцити поміщають в гіпотонічний 10 мМ розчин Na-фосфатного буфера рН 7,4 у співвідношенні 1:10 (температура буфера не повинна перевищувати 4° С).

2. Гемоліз еритроцитів проводять протягом 30 хв при 4° С, періодично перемішуючи суспензію.

3. По закінченні гемолізу «тіні» еритроцитів осаджують центрифугуванням протягом 15 хв при 20000 g (14000 об/хв.). Супернатант обережно відокремлюють від осаду.

4. Для видалення вільної фракції гемоглобіну, що залишилася, осад тричі промивають тим же буфером, переосаджуючи його при 14000 об/хв протягом 15 хв.

5. Кінцевий осад еритроцитарних мембран ресуспендують в ізотонічному 155 мМ розчині NaCl у співвідношенні 1:1.

Отриманий препарат еритроцитарних мембран зберігають при температурі не вище 4° С. В експериментах, спрямованих на вивчення властивостей «тіней» еритроцитів, необхідно використовувати тільки свіжоприготовані суспензії мембран.

Описати спостережувані об'єкти при розгляді препарату мембран у мікроскоп.

Завдання 3. Зробити висновки.**Завдання 4. Розв'язати задачі.**

1. Розрахувати відносне відцентрове прискорення, що діє на еритроцит, якщо ротор центрифуги робить 1000 об/хв і клітина знаходиться на відстані 10 см від осі обертання.

2. Щільність ядер клітин і розчинних білків практично рівні, а величина константи седиментації відповідно має значення 50 S та 10 S. Як відрізняються розміри частинок, якщо вважати їх форму сферичною?

3. На ультрацентрифузі осаджують клітинні ядра діаметром 8 мкм і питомою густиною 1300 кг/м³. Центрифугування проводять на роторі радіусом 5 см, який обертається зі швидкістю $12 \cdot 10^4$ об/хв. Суспензія ядер міститься в буфері з $\rho_0 = 103$ кг/м³ і $\eta = 1,005 \cdot 10^{-3}$ Па·с. З якою швидкістю рухаються ядра до дна центрифужної кювети?

4. Ротор ультрацентрифуги обертається зі швидкістю 33000 об·хв⁻¹. Зафіксовані у часі різні положення піка седиментації відносно осі обертання: $t_1 = 10$ хв, $x_1 = 6,310$ см; $t_2 = 14$ хв, $x_2 = 6,358$ см; $t_3 = 18$ хв, $x_3 = 6,400$ см; $t_4 = 22$ хв, $x_4 = 6,445$ см; $t_5 = 26$ хв, $x_5 = 6,491$ см. Визначити коефіцієнт седиментації білка в цьому експерименті.

5. За допомогою методу седиментаційної рівноваги для невідомого білка знайшли, що після встановлення рівноваги вздовж пробірки концентрації розподілились так: на відстані від осі обертання ротора $r_1=5,95$ см, $c_1=4,72 \cdot 10^{-3}$ кг·л⁻¹, на відстані $r_2=6,23$ см, $c_2=12,96 \cdot 10^{-3}$ кг·л⁻¹. Дослід проводили при 27 °С і швидкості обертання ротора $n=19000$ об·хв⁻¹. Знайти молярну масу невідомого білка, якщо для нього $\bar{V}=0.71$ л·кг⁻¹ і густина буфера $\rho_0=1,1$ кг·л⁻¹.

Завдання 5. Виконати тестові завдання.

1. На частинку в процесі центрифугування діють сили:

- a) відцентрова сила та сила тертя;
- b) відцентрова сила, сила, що виштовхує, та сила тертя;
- c) сила, що виштовхує, та сила тертя;
- d) немає правильної відповіді.

2. За яких умов можливий рівномірний рух частинки при осадженні:

- a) за наявності відцентрової сили та сили, що виштовхує;
- b) при переважанні сили тертя;
- c) при врівноважуванні всіх трьох чинних сил;
- d) при переважанні сили, що виштовхує?

3. Формула визначення коефіцієнта седиментації:

- a) $S = \omega^2 r V$;
- b) $S = \frac{V}{\omega r}$;
- c) $S = V \cdot \frac{1}{\omega^2 r}$;
- d) $S = V \cdot \frac{1}{\omega r^2}$.

4. Від яких фізичних характеристик середовища залежить швидкість осідання частинки:

- a) температура зовнішнього тиску;
- b) щільності середовища та температури;
- c) щільності та в'язкості середовища;
- d) температури, щільності та в'язкості середовища?

5. Від яких фізичних характеристик частинки залежить швидкість її осадження:

- a) маси частинки та її радіуса;
- b) геометричних параметрів частинки;
- c) щільності та радіуса частинки;
- d) фізичні характеристики частинки не впливають на процес?

6. Формула для оцінки відносного відцентрового прискорення:

- a) $\Phi_p = g \omega^2 r$;

$$b) \Phi_p = \frac{\omega^2 r}{g};$$

$$c) \Phi_p = \frac{\omega^2 g}{r};$$

$$d) \Phi_p = \frac{\omega r^2}{g}.$$

7. За яких умов частинка, що осаджується, може залишитися у зваженому стані:

- a) за умови порівняної щільності середовища та частки;
- b) за умови більшої щільності середовища, ніж щільності частинки;
- c) за умови меншої щільності середовища та більшої щільності частинки;
- d) не існує таких умов?

8. Формула для визначення фактора поділу центрифуги:

$$a) \Phi_p = \frac{f_{цб}}{g} = \frac{\omega^2 r}{g};$$

$$b) \Phi_p = \frac{4\pi^2 n^2}{3600g};$$

$$c) \Phi_p = \frac{V^2 r}{g};$$

$$d) \Phi_p = \frac{V^2 r}{h}.$$

9. Фізичний зміст коефіцієнта седиментації:

- a) впливає на швидкість седиментації і залежить від молекулярної маси частинки, парціального об'єму частинки, щільності розчину, коефіцієнта тертя;
- b) залежить від молекулярної маси частинки, парціального об'єму частинки, щільності розчину, коефіцієнта тертя та не впливає на швидкість седиментації;
- c) залежить від молекулярної маси частинки, коефіцієнта тертя;
- d) залежить від щільності розчину, коефіцієнта тертя та впливає на швидкість седиментації.

10. Сутність методу диференційного центрифугування:

- a) виділення клітинних органел з гомогенатів тканин у певні фракції;
- b) виділення клітинних органел з гомогенатів тканин у певні фракції з дотриманням умов повторного центрифугування супернатанта;
- c) виділення клітинних органел з гомогенатів тканин у певні фракції з дотриманням умов повторного центрифугування супернатанта за умов поступового зростання швидкості центрифугування;
- d) розділення тканинного гомогенату на фракції клітинних органел.

11.3 якою метою у методиках центрифугування використовується фактор поділу:

- а) з метою врахування прискорення вільного падіння під час центрифугування;
- б) з метою врахування, у скільки разів відцентрове прискорення перевищує прискорення вільного падіння;
- с) з метою створення однакових умов центрифугування на різних за характеристиками центрифугах;
- д) з метою дотримання методики центрифугування?

Контрольні питання

1. Дайте визначення фактора поділу. З якою метою вводять дану величину?
2. Як залежить час осідання частинок від їх параметрів (радіус, питома вага)?
3. Відтворіть схему отримання чистого препарату методом диференційного центрифугування на прикладі клітинних ядер.
4. Порівняйте умови диференційного центрифугування для ядер і мікросом, для еритроцитів і еритроцитарних мембран. Поясніть відмінності.
6. Чому в роботі застосовується метод гіпоосмотичного гемолізу еритроцитів для отримання осмотично інтактних еритроцитів мембран?
7. Чому тіні еритроцитів є зручним модельним об'єктом дослідження?

Рекомендована література

1. Дубовик В. М., Сухов В. М. Лекції з механіки : навч. посібник. Харків : ХНУ імені В. Н. Каразіна, 2019. 312 с.
2. Міщенко І. В., Павленко Г. П., Коковська О. В. Фізіологія системи крові : навч.-метод. посібник. Полтава, 2019. С. 16-30.
3. Padh H. Organelle isolation and marker enzyme assay. Proceedings of the 13th Workshop/Conference of the Association for Biology Laboratory Education (ABLE). 1992. Vol. 13. P. 129–146.
4. Wilson and Walker's Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology. 8th Edition. Ed. by Hofmann A., Clokie S. Cambridge University Press, 2018. 956 p.
5. Dodge J., Mitchell C., Hanahan D. The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of erythrocytes. Arch. Biochem. Biophys. 1963. V. 100, № 1. P. 119–130.
6. Системи розділення центрифугованої крові на компоненти. <https://redmedua.com/uk/rnews/81-sistemy-razdeleniya-centrifugirovaniya-krovi-na-komponenty>.
7. Відцентрова сила – визначення, принцип, формула, обчислення, приклади. <https://microbiologynote.com/centrifugal-force-definition-principle-formula-calculation-examples/>.
8. Визначення ультрацентрифуги, принцип, типи, використання. <https://microbiologynote.com/types-of-centrifuge/>.
9. Принцип диференціального центрифугування, протокол, використання. <https://microbiologynote.com/differential-centrifugation/>.

Лабораторна робота № 12



ДОСЛІДЖЕННЯ ВЗАЄМОДІЇ ВИСОКОЧАСТОТНОГО ЕЛЕКТРОМАГНІТНОГО ПОЛЯ З РЕЧОВИНОЮ

Мета роботи: дослідження теплового ефекту в результаті впливу змінного електричного поля УВЧ на провідники і діелектрики.

Підготовка до роботи. Повторити наступні питання:

1. Електричні властивості живих тканин.
2. Поняття електричного диполя. Поляризація діелектриків в електричному полі. Види поляризації.
3. Поняття діелектричної проникності. Дисперсія діелектричної проникності.

Електричні властивості біологічних тканин обумовлені їх здатністю проводити і накопичувати електричний заряд під впливом електричного струму і тому характеризуються як активним, так і реактивним (ємнісним) опором. Сумарний опір біологічних тканин називається імпедансом.

Ємнісний опір має частотну залежність: $R_x = \frac{1}{\omega c}$, де ω – кругова частота струму. Це є однією з причин залежності імпедансу біологічних тканин від частоти струму. Зміна імпедансу зумовлена також залежністю поляризації біологічних тканин від періоду дії змінного струму.

Під впливом змінного електричного поля біологічні тканини виявляють властивості як провідників, так і діелектриків.

Органічні речовини (білки, жири, вуглеводи), з яких складаються живі тканини, в чистому і сухому вигляді є діелектриками. Однак усі тканини в організмі містять або омиваються рідинами (кров, лімфа, тканинні рідини), до складу яких, крім органічних колоїдів, входять розчини електролітів. Наявність цих рідин обумовлює провідні властивості біологічних тканин.

Величина взаємодії зовнішнього змінного електричного поля з середовищем залежить від електричних властивостей цього середовища – *електричної провідності* (k) і *діелектричної проникності* (ϵ). Під **провідністю** розуміють здатність середовища проводити електричний струм. Провідність зумовлена наявністю вільних носіїв заряду, тому величина k , в першу чергу, залежить від концентрації вільних носіїв заряду в середовищі. У біологічних середовищах в якості вільних носіїв заряду виступають іони. Такий механізм проведення електричного струму має назву **іонного**, або **електролітичного**. У тому випадку, якщо заряджені частинки при русі в будь-якому напрямку

не можуть подолати потенційний енергетичний бар'єр, то вони вважаються **зв'язаними**. Зв'язаними зарядами є заряди, що входять до складу атомів і молекул середовища. Середовища, в яких кількість пов'язаних зарядів перевищує кількість вільних носіїв заряду, є слабопровідними середовищами і характеризуються діелектричними властивостями.

При розташуванні електролітів у зовнішньому змінному електричному полі УВЧ-діапазону в середовищі встановлюється спрямований рух іонів з утворенням внутрішніх струмів. Процеси провідності супроводжуються втратами електричної енергії у вигляді тепла, за рахунок внутрішнього тертя при направленому русі частинок. Кількість тепла, яка виділена в електроліт:

$$q_1 = \frac{E^2}{\rho}, \quad (1)$$

де E – ефективне значення напруженості електричного поля; ρ – питомий опір електроліту.

При розташуванні діелектриків у зовнішньому змінному електричному полі УВЧ-діапазону відбувається зсув зв'язаних зарядів у просторі, причому заряди, що мають різні знаки, зміщуються в протилежних напрямках. В результаті зсуву зв'язані заряди створюють у середовищі поле $\vec{P}$, протилежно спрямоване зовнішньому полю $\vec{E}$ (рис. 1). Це явище називається **поляризацією діелектрика**. Створюване внутрішнє поле $\vec{P}$ буде зменшувати напруженість зовнішнього електричного поля. Величина, що показує, у скільки разів зменшується напруженість електричного поля в діелектрику, називається **діелектричною проникністю**. Постійна діелектричної проникності характеризує здатність речовини послаблювати зовнішнє електричне поле або, іншими словами, здатність його до поляризації.

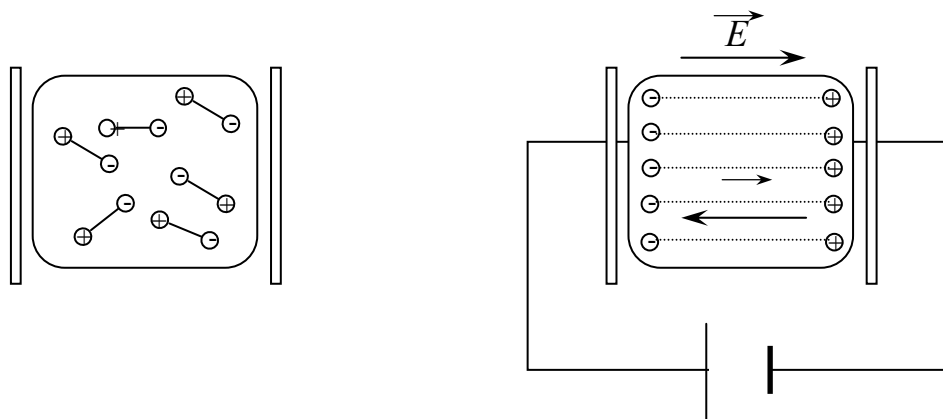


Рис. 1. Зсув зв'язаних зарядів діелектрика, розташованого у зовнішньому змінному електричному полі

Поляризація в середовищі встановлюється не миттєво слідом за включенням зовнішнього поля, а вимагає певного часу для досягнення рівноважного значення. Час, протягом якого відбувається утворення і орієнтація диполів вздовж силових ліній електричного поля, називається **часом релаксації поляризації**.

Під дією високочастотного електричного поля в діелектрику відбувається безперервна переорієнтація дипольних молекул. При цьому, якщо час релаксації поляризації середовища більше періоду коливальних зовнішнього електричного поля, то диполі не встигають орієнтуватися уздовж силових ліній електричного поля і будуть здійснювати коливальні рухи. За рахунок сил внутрішнього тертя при коливальному русі диполів у середовищі діелектрика відбувається втрата електричної енергії у вигляді тепла. Кількість тепла, яка виділена в діелектрику:

$$q_2 = \omega E \varepsilon \varepsilon_0 \operatorname{tg} \delta, \quad (2)$$

де ω – кругова частота коливальних; ε – відносна діелектрична проникність діелектрика; ε_0 – електрична постійна; E – напруженість поля; $\operatorname{tg} \alpha$ – кут діелектричних втрат.

Теплові втрати, що виникають у результаті орієнтаційних ефектів електричних диполів у зовнішньому змінному електричному полі, називаються діелектричними втратами.

Під впливом поля УВЧ біологічні тканини виявляють властивості як провідників, так і діелектриків, тому в тканинах буде виділятися тепло в кількості, що дорівнює:

$$q = q_1 + q_2. \quad (3)$$

У діелектриках виділяють наступні види поляризації з характерним для них часом релаксації:

- електронна (10^{-16} - 10^{-14} с);
- іонна (10^{-14} - 10^{-12} с);
- орієнтаційна (10^{-13} - 10^{-7} с);
- макроструктурна (10^{-8} - 10^{-3} с);
- поверхнева (10^{-3} - 10^0 с).

Якщо напівперіод змінного струму більше часу релаксації будь-якого виду поляризації, то ефективна діелектрична проникність і провідність об'єкта не будуть змінюватися з частотою. Якщо зі зростанням частоти напівперіод змінного струму стає менше часу релаксації, діелектрична проникність починає зменшуватися з частотою, а провідність – зростати. З ростом частоти змінного поля період електричних коливальних зменшується. Види поляризації з великими часами релаксації не будуть проявлятися, тоді величину діелектричної проникності визначатимуть інші види поляризації з меншим часом релаксації. Тому з ростом частоти буде зменшуватися

величина діелектричної проникності. Частотна залежність діелектричної проникності називається **дисперсією діелектричної проникності**.

Запізнення зміни поляризованості середовища відносно зміни напруженості електричного поля залежить від механізму поляризації даного середовища. У біологічних тканинах виділяють три області дисперсії діелектричної проникності:

α -дисперсія займає область низьких частот (до 10 кГц). Зменшення діелектричної проникності біологічних систем у даній області зумовлене поляризацією цілих клітин у результаті дифузії іонів (зменшується ефект поляризації поверхні клітин). Для струмів низької частоти клітина має високий опір, тому вплив електричного поля проявляється тільки на рівні міжклітинного простору. Електричні властивості біологічних об'єктів в області α -дисперсії пояснюються ефектом поверхневої поляризації.

β -дисперсія спостерігається в області частот 10-10⁴ кГц. На даних частотах на змінне електричне поле встигають реагувати біологічні макромолекули (наприклад, білки), оскільки мають значну масу. Електричні властивості біологічних об'єктів в області β -дисперсії пояснюються ефектом макроструктурної поляризації.

γ -дисперсія спостерігається в області вище 10⁶ кГц. Зменшення діелектричної проникності в цьому діапазоні зумовлене ослабленням ефекту орієнтаційної поляризації, що викликається диполями води. Величина γ -дисперсії буде залежати від вмісту вільної води в досліджуваних тканинах.

Загальна картина частотної залежності електричних параметрів зберігається для всіх типів тканин, що зумовлено єдністю структури і хімічного складу клітин. У кожному конкретному випадку індивідуальні особливості об'єктів обумовлюють характер частотної залежності. До таких особливостей відносяться розміри і форма клітини, величина мембранної проникності, співвідношення між об'ємом клітини і міжклітинного простору, вміст вільних іонів у клітині, наявність вільної води і таке інше.

Біологічна дія полів УВЧ. У біології та медицині прийнято умовне розділення електромагнітних коливань на частотні діапазони (табл. 1).

Таблиця 1

Частотні діапазони електромагнітних коливань

Низькі (НЧ)	до 20 Гц
Звукові (ЗЧ)	20 Гц – 20 кГц
Ультразвукові або надтональні (УЗЧ)	20 кГц – 200 кГц
Високі (ВЧ)	200 кГц – 30 МГц
Ультрависокі (УВЧ)	30 МГц – 300 МГц
Надвисокі (НВЧ)	300 МГц – 300 ГГц
Крайвисокі (КВЧ)	Більше 300 ГГц

Одним з поширених фізіотерапевтичних методів є УВЧ-терапія – вплив на тканини і органи змінним електричним полем ультрависокої частоти (30-300 МГц). УВЧ-терапія застосовується при лікуванні запальних процесів у кістках і суглобах, невралгії, бронхіальної астми та інших захворювань.

Загальну дію електричного поля УВЧ умовно можна розділити на специфічну і теплову. **Специфічна дія** обумовлена релаксаційними коливаннями глобулярних білків, глікопротеїдів, гліколіпідів, фосфоліпідів клітинних мембран, характеристичні частоти яких відповідають області β -дисперсії біологічних тканин. При цьому частка енергії, яка втрачається на структурні перебудови молекулярних комплексів, значно перевищує енергію, яка йде на загальний нагрів тканини, і фізіологічні механізми теплопередачі виявляються в змозі утилізувати тепло, що виділяється. Конформаційні зміни молекулярних комплексів, у свою чергу, призводять до збільшення дисперсності білків і фосфоліпідів, що позначається на біохімічній активності перших і збільшенні проникності мембранних структур в цілому. В результаті цього відбувається активація різних іон-транспортних систем, процесів вільно-радикального і ферментативного окислення. На цій основі формуються неспецифічні метаболічні реакції клітин, що визначають лікувальний ефект дії УВЧ, як то збільшення гемопоезу, посилення фагоцитарної активності лейкоцитів, стимуляція імуногенезу.

Теплова дія обумовлена тим, що питома потужність тепловиділення (в результаті коливального й обертального рухів частинок у в'язкому середовищі) перевищує потужність, що відводиться за допомогою механізмів теплопередачі (теплопровідність, конвекція, випаровування і випромінювання), тобто фізіологічні механізми теплопередачі виявляються не в змозі відводити все тепло, що виділяється, і, як наслідок цього, відбувається розігрів тканини. Тканини, насичені водою (кров, лімфа, м'язова тканина), мають в цьому частотному діапазоні значне значення ε і k , проте їх нагрівання відбувається на порядок менше в порівнянні з тканинами зі зниженим вмістом води (нервова, кісткова, сполучна тканини, підшкірна жирова клітковина), що пов'язано з високою теплопровідністю перших. Нагрівання органів і тканин під дією електричного поля УВЧ викликає розширення капілярів і збільшення швидкості кровотоку, підвищує проникність ендотелію і прискорює лімфодинаміку. Основу формування загальної реакції організму становить збудження різних ентеро- та інтерорецепторів і фізико-хімічних змін у них. Зокрема під впливом УВЧ підвищується тромбобластична активність плазми і гіперкоагуляція.

Оскільки теплота, що виділяється, залежить від діелектричної проникності тканин і їх питомого опору, то, підбираючи відповідну частоту, можна здійснити переважне виділення тепла в потрібних тканинах і орга-

нах. Більше того, комбінована дія струмів провідності і струмів зсуву відповідних частот дозволяє селективно нагрівати ці тканини та органи.

Установка для УВЧ-терапії складається з двох основних частин (рис. 2): лампового генератора (ЛГ) і терапевтичного контуру (ТК). Генератор виробляє електричні коливання частотою 40,68 МГц. Терапевтичний контур індуктивно зв'язаний з анодним коливальним контуром генератора і включає в себе дискові електроди пацієнта (ЕП), за допомогою яких здійснюється вплив електричним полем УВЧ на пацієнта, і змінного конденсатора настройки. Індуктивний зв'язок виключає можливість потрапляння хворого під високу напругу, яка використовується в генераторі.

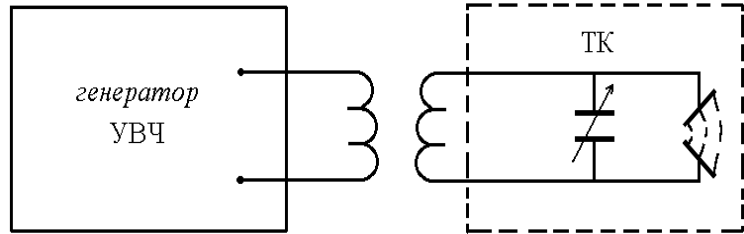


Рис. 2. Блок-схема апарату УВЧ-66 для УВЧ-терапії

Найбільша потужність виділяється в терапевтичному контурі за умови резонансу, тобто коли частота власних коливань терапевтичного контуру збігається з частотою генератора. Власна частота коливального контуру залежить від його індуктивності L і ємності C :

$$\omega = \frac{1}{\sqrt{LC}}.$$

Ємність терапевтичного контуру складається з ємності між електродами пацієнта і ємності змінного конденсатора C_n . Оскільки при різних процедурах ємність між електродами пацієнта змінюється, то кожен раз необхідно робити налаштування терапевтичного контуру в резонанс, змінюючи ємність змінного конденсатора.

На передній панелі приладу розташовані наступні елементи управління:

- перемикач «НАПРУГА» слугує для забезпечення робочого режиму апарату в умовах відхилення напруги в мережі від номінального;
- кнопка «КОНТРОЛЬ» дозволяє здійснити контроль напруги мережі при натисканні;
- перемикач «ПОТУЖНІСТЬ», що має чотири положення: 0, 20, 40, 70 Вт, слугує для зміни потужності поля, що створюється генератором;
- перемикач «НАСТРОЙКА» змінює ємність змінного конденсатора терапевтичного контуру. Контроль налаштування терапевтичного контуру здійснюється за допомогою стрілочного вимірювального приладу.

На правій бічній стороні приладу укріплені два кронштейни для установки електродотримачів, що мають шарнірні з'єднання, які дозволяють встановити електроди в різні положення.

Розподіл напруженості електричного поля між електродами пацієнта залежить від розмірів електродів, відстані між ними та від їх взаємного розташування. Деякі випадки показані на рис. 3.

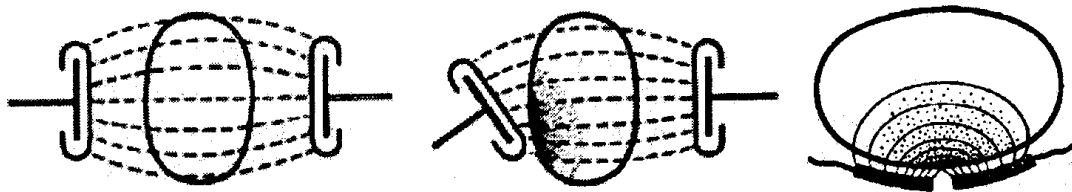


Рис. 3. Розподіл напруженості електричного поля між електродами пацієнта

Щоб уникнути опіків струмами високої частоти, ЗАБОРОНЯЄТЬСЯ підносити до проводів і електродів апарату металеві предмети, а також замінювати електроди й дроти при ввімкнутому пристрої. Під час вимірювань не слід знаходитися дуже близько біля приладу.

Виконання роботи

Лабораторне обладнання та матеріали: апарат для високочастотної терапії, кювети з електролітом і діелектриком, термометр.

Перед початком виконання роботи уважно вивчіть конструкцію, призначення і розташування перемикачів настройки апарату УВЧ-66. Необхідно переконатися в тому, що апарат має заземлення, а перемикач «НАПРУГА» знаходиться в положенні «ВИМК». Щоб уникнути опіків струмами високої частоти, забороняється підносити до дротів і електродів апарату металеві предмети, а також замінювати електроди та дроти при ввімкнутому пристрої.

Завдання 1. Дослідження просторового розподілу електричного поля УВЧ.

Цей розподіл можна досліджувати за допомогою дипольної антени, що являє собою два провідники, між якими включено напівпровідниковий діод. Сила струму, що виникає в контурі дипольної антени, пропорційна напруженості електричного поля УВЧ. Дипольна антена розташовується на дерев'яній рейці, яка може рухатися у вертикальному і горизонтальному напрямках по направляючих з метричною шкалою.

1. Встановити електроди на відстані, заданій викладачем, і розташувати в центрі між ними дипольну антену. При цьому міліамперметр, підключений до антени, повинен знаходитися якнайдалі від електродів апарату.

2. Увімкнути апарат УВЧ, для чого перемикач «НАПРУГА» поставити в положення 1. При цьому повинна загорітися сигнальна лампочка.

Натискаючи кнопку «КОНТРОЛЬ» і обертаючи перемикач «НАПРУГА», встановити стрілку індикатора апарату на середину червоного сектора.

3. Встановити перемикач «ПОТУЖНІСТЬ» на задане значення і перемикачем «НАСТРОЙКА» домогтися максимального відхилення стрілки індикатора.

4. Переміщуючи дипольну антену в горизонтальному напрямку вліво і вправо від центра на відстань l_x , через кожен сантиметр вимірювати силу струму I .

5. Переміщуючи дипольну антену у вертикальному напрямку вгору і вниз від центра на відстань l_y , через кожен сантиметр вимірювати силу струму I .

6. Результати вимірювань занести в табл. 2.

Таблиця 2

Характеристики просторового розподілу електричного поля УВЧ

Горизонтальна площа				Вертикальна площа			
l_x , см	I , мА	l_x , см	I , мА	l_y , см	I , мА	l_y , см	I , мА

7. Побудувати графіки залежності сили струму I від положення антени l_x і від l_y .

Завдання 2. Отримання резонансних кривих терапевтичного контуру.

1. Встановити електроди пацієнта на відстані 10 см і помістити дипольну антену в центрі між ними; вивести ручку настройки в крайнє ліве положення. Провести вимірювання при відстані 20 см.

2. Обертаючи ручку «НАСТРОЙКА», через кожний розподіл n шкали настройки зняти показання міліамперметра I при зміні положення ручки.

3. Результати вимірювань занести в табл. 3.

Таблиця 3

Характеристики резонансних кривих терапевтичного контуру

n										
I , мА (10 см)										
I , мА (20 см)										

Завдання 3. Дослідження теплового впливу поля УВЧ на електроліти та діелектрики.

Для вивчення теплового впливу електричного поля УВЧ на електроліти та діелектрики між електродами встановлюються кювети з оргскла з досліджуваними рідинами. Кількість рідини в кюветах підбирається так,

щоб їх теплоємності були однакові. Зміна температури визначається за показаннями термометра.

1. Помістити кювету з фізіологічним розчином між електродами апарату і виміряти початкову температуру T_1 рідини в кюветі.

2. Увімкнути апарат і налаштувати терапевтичний контур в резонанс.

3. Оцінити тепловий ефект, реєструючи зміни температури з часом. Вимірювання проводити в діапазоні температур від 20 °С до 45 °С. Час реєструвати з кожною зміною температури на 1 °С. Результати вимірювань занести в табл. 4.

4. Повторити дії п.п. 1–3 для різних експериментальних зразків (дистильована вода, спирт, розчин сахарози, рослинне масло), за зразок замість фізіологічного розчину розчин сахарози, а потім рослинне масло. Результати вимірювань занести в табл. 4.

5. Побудувати графік залежності температури $T, ^\circ\text{C}$ досліджуваних рідин від часу t , хв. впливу на них електричного поля УВЧ.

Таблиця 4

Тепловий ефект електричного поля УВЧ в різних розчинах

$T, ^\circ\text{C}$	t , хв. (розчин NaCl)	t , хв. (H ₂ O)	t , хв. (розчин C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁)	t , хв. (C ₂ H ₅ OH)	t , хв. (рослинне масло)

Завдання 4. Зробити висновки.

Завдання 5. Розв'язати задачі.

1. При фазовому переході мембранних фосфоліпідів з рідкокристалічного стану в гель товщина бішару змінюється. Як зміниться електрична ємність мембрани?

2. Під час потенціалу дії провідність мембрани збільшується, а ємність практично не змінюється. Поясніть цей факт, виходячи з особливостей структури мембрани і зміни цієї структури при збудженні.

3. Чим забезпечується генерація електричного поля на біомембрані та від чого залежить величина напруженості поля на мембрані?

4. Вимірюють зміну імпедансу суспензії клітин на таких частотах змінного електричного поля: 10, 102, 104, 106 і 107 Гц. Електричні параметри клітинної мембрани $R_M = 1 \text{ кОм}\cdot\text{см}^2$ і $C_M = 1 \text{ мкФ/см}^2$. Припустивши, що опір і ємність включені паралельно, розрахувати величину імпедансу на цих частотах. Побудувати графік залежності імпедансу від частоти.

5. Для прогрівання м'язової тканини на плоскі електроди подають напругу $U = U_0 \sin \omega t$ з амплітудою $U_0 = 250 \text{ В}$ і частотою $\nu = 106 \text{ Гц}$. Активний

опір цієї ділянки кола $R=103 \text{ Ом}$, ємність $C=5 \cdot 10^{-8} \text{ Ф}$. Визначити кількість тепла, що виділяється в об'ємі тканин між електродами за час $t=10 \text{ хв}$.

Завдання 6. Виконати тестові завдання.

1. Терапевтичний контур в апараті УВЧ-терапії призначений для:
 - a) посилення біопотенціалів;
 - b) забезпечення безпеки пацієнтів;
 - c) генерації електромагнітних коливань;
 - d) реєстрації різниці потенціалів між двома точками на поверхні тіла.
2. Конденсатор змінної ємності в терапевтичному контурі апарату УВЧ-терапії призначений для зміни:
 - a) частоти коливань анодного коливального контуру;
 - b) амплітуди коливань в анодному коливальному контурі;
 - c) власної частоти коливань терапевтичного контуру;
 - d) імпедансу терапевтичного контуру.
3. Вкажіть частоту коливань, які використовуються для УВЧ-терапії:
 - a) 30,2 МГц;
 - b) 20 кГц;
 - c) 1000 Гц;
 - d) 40,58 МГц;
 - e) 40 кГц.
4. При УВЧ-терапії на пацієнта діє:
 - a) змінне електричне поле;
 - b) змінне магнітне поле;
 - c) постійний електричний струм;
 - d) змінний електричний струм.
5. Кількість теплоти, що виділяється в електролітах, які знаходяться в електричному полі УВЧ, визначається за формулою:
 - a) $q = \frac{\omega E^2 \operatorname{tg} \delta}{\varepsilon \varepsilon_0}$;
 - b) $q = \frac{E^2}{\rho}$;
 - c) $q = E^2 \rho$;
 - d) $q = \omega E^2 \varepsilon \varepsilon_0 \operatorname{tg} \delta$.
6. Електродинамічна характеристика середовища, яка показує, у скільки разів зменшується кулонівська взаємодія зарядів за умов їх переносу з вакууму в дане середовище:
 - a) діелектричні втрати;
 - b) діелектрична проникність;
 - c) діелектрична сприйнятливість;

d) поляризованість середовища.

7. Тепловий ефект в біологічних тканинах за умов дії змінних електричних полів можливий внаслідок:

- a) ефекту поляризації;
- b) спрямованого руху носіїв заряду;
- c) ефекту поляризації та спрямованого руху носіїв заряду;
- d) даний ефект не можливий в біологічних тканинах.

8. Електропровідність біологічних тканини зумовлена:

- a) високим вмістом води;
- b) різноманітним молекулярним складом;
- c) високим вмістом іонів;
- d) високим вмістом білкових молекул.

9. Кількість теплоти, що виділяється в діелектриках, які знаходяться в електричному полі УВЧ, визначається за формулою:

a) $q = \frac{\omega E^2 \operatorname{tg} \delta}{\varepsilon \varepsilon_0}$;

b) $q = \frac{E^2}{\rho}$;

c) $q = E^2 \rho$;

d) $q = \omega E^2 \varepsilon \varepsilon_0 \operatorname{tg} \delta$.

10. При взаємодії змінного електричного поля УВЧ-діапазону з діелектриком відбувається:

- a) спрямований рух носіїв заряду;
- b) релаксація електричних диполів;
- c) поляризація електричних диполів;
- d) ефекти відсутні.

11. При взаємодії змінного електричного поля УВЧ-діапазону з електролітом відбувається:

- a) спрямований рух носіїв заряду;
- b) релаксація електричних диполів;
- c) поляризація електричних диполів;
- d) ефекти відсутні.

12. Кількість теплоти, що виділяється в біологічних тканинах, які знаходяться в електричному полі УВЧ, визначається за формулою:

a) $q = \frac{\omega E^2 \operatorname{tg} \delta}{\varepsilon \varepsilon_0}$;

b) $q = \frac{E^2}{\rho}$;

c) $q = \omega E^2 \varepsilon \varepsilon_0 \operatorname{tg} \delta$;

d) $q = \omega E^2 \varepsilon \varepsilon_0 \operatorname{tg} \delta + \frac{E^2}{\rho}$.

Контрольні питання

1. Які особливості електричних властивостей біологічних тканин?
2. Дайте визначення електропровідності біологічних тканин.
3. Що розуміють під поляризацією тканин, дисперсією діелектричної проникності, областю дисперсії діелектричної проникності?
4. Що розуміють під електричною провідністю і діелектричною проникністю середовища?
5. Які явища називають поляризацією і релаксацією середовища?
6. Чим обумовлена дисперсія електричних характеристик біологічних тканин?
7. Який механізм взаємодії змінного електричного поля УВЧ діапазону з електролітами?
8. Який механізм взаємодії змінного електричного поля УВЧ діапазону з діелектриками?
9. Поясніть механізм теплової дії УВЧ електричного поля на електроліти та діелектрики.
10. Яка природа теплового ефекту дії змінних електричних полів на середовище і від яких властивостей середовища залежить величина цього ефекту?

Рекомендована література

1. Чалий О. В., Цехмістер Я. В., Агапов В. Т., Меленевська А. В., Мурашко М. Л., Радченко Н. Ф., Стучинська Н. В. Медична і біологічна фізика. Київ : Книга плюс, 2004. 760 с.
2. Дідух В. Д., Рудяк Ю. А., Багрій-Заяць О. А. Біологічна фізика з фізичними методами аналізу : навч. посібник. Тернопіль, 2021. 305 с.
3. Медична і біологічна фізика : практикум / за ред. О. В. Чалого. Київ : Книга плюс, 2003. 217 с.
4. Терещенко М. Ф., Тимчик Г. С., Яковенко І. О. Біофізика : підручник. Київ : КПІ ім. Ігоря Сікорського, 2019. 444 с.
5. Терещенко М. Ф., Тимчик Г. С., Яковенко І. О. Біофізика : практикум. Київ : КПІ ім. Ігоря Сікорського, 2019. 288 с.
6. Тимчик Г. С., Філіпова М. В., Діордіца І. М. Фізіотерапевтична апаратура. Київ : КПІ ім. Ігоря Сікорського, 2012. 280 с.

Лабораторна робота № 13



ВПЛИВ ФІЗИЧНИХ ФАКТОРІВ НА РОЗПОДІЛ ЕРИТРОЦИТІВ ЗА СТІЙКІСТЮ

Мета роботи: вивчити розподіл еритроцитів за стійкістю в нормі та після впливу фізичного чинника, отримати і проаналізувати диференційну та інтегральну еритрограми.

Підготовка до роботи. Повторити наступні питання:

1. Особливості будови еритроцитарної мембрани.
2. Оптичні властивості макромолекул плазматичних мембран еритроцитів.
3. Принцип фотоелектроколориметричних вимірювань процесу гемолізу еритроцитів.

Сукупність фізико-хімічних властивостей плазматичної мембрани еритроциту визначають стійкість клітини до дії пошкоджуючих чинників. Відомо, що стійкість еритроцитів визначається їх віком: молоді еритроцити, що виходять з кісткового мозку, мають найбільшу стійкість і, навпаки, старі еритроцити є мало стійкими. *В якості критерію, що визначає стійкість еритроцитів, можна використовувати їх здатність до гемолізу за умов дії гемолітичних речовин. При цьому мірою стійкості слугує час гемолізу.* Час гемолізу також знаходиться в прямій залежності від концентрації гемолітика. Серед низки гемолітиків найбільш стабільними є неорганічні кислоти. Відомо, що гемоліз нормальної людської крові, що викликається 0,002 М розчином HCl, триває 6÷8 хв. Крива розподілу еритроцитів за стійкістю називається **еритрограмою**.

Метод кислотних еритрограм. Суть методу полягає в фотоколориметрії динаміки розпаду еритроцитів за умов дії гемолітичної речовини (соляної кислоти). Тривалість гемолізу, що протікає при постійній температурі і концентрації соляної кислоти, слугує мірою стійкості еритроцитів. В результаті експериментальних досліджень отримують ряд показників **оптичної щільності D**, яка з часом спадає. Це зменшення оптичної щільності в часі характеризує руйнування еритроцитів за умов дії гемолітичної речовини і відповідає ступеню гемолізу з моменту відліку. Вплив різних чинників на еритроцити буде відображатися у зміні форми і зсуві максимуму еритрограм у порівнянні з контролем.

Виконання роботи

Лабораторне обладнання та матеріали: фотоелектричний колориметр КФК, секундомір, пробірки, скляні палички, дозаторні піпетки; фізіологічний розчин, еритромаза, гемолітик (0,002 М HCl на фізіологічному розчині).

Завдання 1. Вибрати умови проведення гемолізу для контрольного зразка.

1. Приготувати 1 % суспензію еритроцитів у фізіологічному розчині.
2. Підготувати фотоколориметр до роботи: встановити червоний світлофільтр (670 нм); в кюветне відділення № 1 встановити кювету ($d=5$ мм) з фізіологічним розчином і регулюванням чутливості домогтися значення $T=100$ % за шкалою пропускання.

3. У другу кювету ($d = 5$ мм) помістити 1,5 мл гемолітика і додати 0,7 мл 1 % суспензії еритроцитів. Перемішати суспензію скляною паличкою до однорідного стану і зафіксувати час за секундоміром та заміряти значення оптичної щільності D .

4. Початкове значення оптичної щільності має становити $0,7 \pm 0,1$. Якщо значення D не потрапляє до зазначеного інтервалу, то необхідно розбавити вихідну суспензію еритроцитів фізіологічним розчином. При цьому кількість ΔV розчину, яку необхідно додати в початковий об'єм V суспензії еритроцитів, можна розрахувати за формулою:

$$\Delta V = (D/0,7 - 1) \cdot V. \quad (1)$$

5. Показання фотоколориметра вносити в таблицю через рівні інтервали часу (10 с) до моменту закінчення гемолізу (припинення зміни оптичної щільності). Максимальна швидкість зміни D повинна настати через 3÷4 хв. У випадку, якщо гемоліз відбувається занадто швидко, необхідно зменшити концентрацію гемолітика, в протилежному випадку – збільшити. Повторити досліди і отримати залежність моменту настання максимальної швидкості гемолізу від концентрації HCl.

$t, \text{с}$									
D_i									

6. Для концентрації гемолітика, відповідної нормальному протіканню гемолізу, зробити повторне вимірювання контрольного зразка. При цьому інтервали часу реєстрації показань приладу на початковому і кінцевому етапах можна збільшити. Оцінити похибку експерименту.

Завдання 2. Побудувати диференціальну і інтегральну еритрограми для контрольного зразка.

Для побудови еритрограми необхідно заповнити наступну таблицю:

$t, \text{с}$	D_i	ΔD_i	$\% \Delta D_i$	$\% D_i$	$t, \text{с}$	D_i	ΔD_i	$\% \Delta D_i$	$\% D_i$

t – час з моменту відліку;

D_i – значення оптичної щільності суспензії еритроцитів;

ΔD_i – різниця між поточним і попереднім значеннями оптичної щільності: $\Delta D_i = |D_i - D_{i-1}|$;

$\% \Delta D_i$ – процентне значення ΔD_i :

$$\% \Delta D_i = \frac{\Delta D_i}{\Delta D} \cdot 100, \quad (2)$$

де ΔD – величина, що дорівнює різниці між початковим значенням оптичної щільності і значенням оптичної щільності після закінчення гемолізу;

$\% D_i$ – результат послідовного підсумовування даних 4-ї колонки, що визначаються за формулою:

$$\% D_i = \frac{D_1 - D_i}{\Delta D} \cdot 100, \quad (3)$$

де D_i – показання оптичної щільності в даний момент часу.

Протікання гемолізу можна зобразити графічно, побудувавши часову залежність $\% D_i$, яка відображатиме зростаючий відсоток гемолізованих еритроцитів. Побудована крива, що має S-подібний вигляд, називається **інтегральною еритрограмою** $[\% D_i(t)]$. Розподіл еритроцитів за стійкістю характеризує **диференціальна еритрограма** $[\% \Delta D_i(t)]$. Диференціальна еритрограма відповідає графічному зображенню зміни в часі відсотка гемолізованих еритроцитів протягом певного проміжку часу від загального їх числа, тобто відповідає кривій залежності $\% \Delta D_i$ від часу. Диференціальну еритрограму зручно використовувати для аналізу кривої розподілу (визначення основної групи стійкості, дисперсії за стійкістю, асиметрії розподілу щодо центру розподілу).

Завдання 3. Методом побудови кислотних еритрограм дослідити дію фізичних факторів на еритроцити.

1. Досліджуваний зразок суспензії еритроцитів піддати впливу фізичного чинника. Отримати для нього інтегральну і диференціальну еритрограми, відповідно до завдання 2.

2. Оцінити пошкоджуючу дію (ПД) щодо зміщення центра розподілу:

$$ПД = \frac{t_m^k - t_m}{t_m^k} \cdot 100\% \quad (4)$$

де t_m^k і t_m – час гемолізу основної групи стійкості відповідно для контрольного і досліджуваного зразка (час, що відповідає максимальному значенню ΔD_i для диференціальної еритрограми). Проаналізувати шкідливу дію фізичного чинника, враховуючи особливості структури мембран еритроцитів різного віку.

Завдання 4. Отримати безпосередній запис диференціальної еритрограми.

Принцип безпосереднього запису диференціальної еритрограми полягає у вимірюванні динаміки зміни оптичної щільності зразка еритроцитів

відносно зразка, приготованого за тих же умов раніше на час Δt . Перевага безпосереднього способу запису полягає в тому, що він дозволяє уникнути розкиду значень ΔD_i , викликаного неоднаковими інтервалами часу при реєстрації D_i в процесі гемолізу. Для кожного вимірювання, незалежно від поточного часу, цей інтервал буде постійним і дорівнює Δt ; таким чином, дотримується вимога рівності інтервалів часу реєстрації. Час Δt буде відповідати інтервалам реєстрації показань ФЕКа для звичайного запису динаміки гемолізу. Інтервали реєстрації можна змінювати, варіюючи різницю часу приготування зразків. Вибору оптимального значення Δt відповідає інтервал часу, рівний різниці між моментом, коли швидкість гемолізу найбільша (час t_m , відповідає максимальному значенню ΔD_i для диференціальної еритрограми), і моментом часу t , коли це значення зменшується вдвічі. При нормальному перебігу гемолізу $\Delta t = 30 \div 40$ с.

1. У дві кювети помістити по 1,5 мл гемолітика, концентрація якого відповідає нормальному перебігу гемолізу.

2. У кювету № 1 додати 0,7 мл суспензії еритроцитів і перемішати. У момент додавання еритроцитів почати відлік часу за секундоміром. Після перемішування виміряти оптичну щільність D_1 відносно фізіологічного розчину.

3. Через час Δt після початку відліку додати 0,7 мл суспензії еритроцитів у кювету № 2, перемішати і виміряти оптичну щільність D_2 відносно фізіологічного розчину. Головною вимогою виконання пп. 2, 3 є приготування оптично ідентичних зразків $D_2 - D_1$. Час Δt слід прийняти рівним оптимальному значенню, отриманому з диференціальної еритрограми (завдання 2).

4. Встановити на місце кювети з фізіологічним розчином кювету № 1 в якості порівнювальної і регулюванням чутливості домогтися показання приладу для неї 100 % за шкалою T . У тому випадку, якщо виявляється неможливим встановити 100 % значення пропускання для кювети № 1, то слід встановити максимально можливе значення пропускання і безпосередньо перед кожним наступним виміром здійснювати контроль пропускання для кювети № 1, підтримуючи саме це значення. Зняти для кювети № 2 показання оптичної щільності і час за секундоміром.

5. Провести вимірювання часової залежності D для кювети № 2 відносно кювети № 1. Кількість вимірювань вибрати виходячи з вимоги отримання гладкої кривої. Відсутність зміни різниці показань приладу для кювет № 1 і № 2 буде вказувати на закінчення гемолізу.

6. По закінченню гемолізу замінити кювету № 1 кюветою з фізіологічним розчином. Виставити для останньої 100 % за шкалою T і виміряти оптичну щільність D для кювети № 2.

7. Розрахувати відсоткове значення різниці оптичної щільності за формулою:

$$\% \Delta D = \frac{D}{\Delta D} \cdot 100, \quad (5)$$

де $\Delta D = D_n - D_k$ – різниця між абсолютними початковим і кінцевим значеннями в кюветах № 1 та № 2. Побудувати залежність $\% \Delta D$ від часу. Заповнити таблицю отриманими експериментальними даними.

t, c	D_i	ΔD_i	$\% \Delta D_i$	$\% D_i$

Завдання 5. Зробити висновки.

Завдання 6. Розв'язати задачі.

1. Визначити іонну силу розчину, який містить 10^{-3} М CaCl_2 і 10^{-3} М NaCl .

2. Визначити іонну силу розчину, який містить 0,9 % NaCl .

3. Розрахувати рН водного розчину:

а) 0,2 М HCl ;

б) 10^{-8} М HCl .

Проаналізуйте гемолітичну активність зазначених розчинів соляної кислоти.

4. Для розриву еритроцитів їх вміщують у розчин зі зниженим осмотичним тиском (гіпотонічний розчин), в якому клітини поглинають воду доти, доки вони не розриваються (гемоліз). При 27°C еритроцити повністю гемолізуються в 0,35 % розчині NaCl . Приймавши тангенціальне напруження мембрани еритроцита $6 \cdot 10^{-8}$ Па і товщину мембрани 10 нм, визначити, на скільки зростає діаметр еритроцитів перед тим, як вони гемолізуються, якщо в ізотонічному розчині їхній діаметр дорівнює 7,5 мкм.

5. При 27°C інтактні клітини (радіус 5 мкм і товщина мембрани 10 нм) зберігають сферичну форму в ізотонічному 0,6 % розчині NaCl . При перенесенні їх у гіпотонічні розчини вони починають швидко набрякати і в 0,3 % розчині NaCl розриваються. У скільки разів збільшується їхній об'єм при лізисі?

6. Ліпосоми реагують на зміни осмотичного тиску подібно осмометрам, тому що вони добре пропускають воду і дуже погано розчинні солі. При обробці ультразвуком при 27°C у воді «замикаються» ліпосоми діаметром 80 нм, товщина біліпідної мембрани 6 нм. Знайти тангенціальну напруженість мембрани ліпосоми. При якій граничній концентрації (в молях) NaCl ліпосоми не будуть розриватися? Прийняти для ліпосоми $\sigma = 2 \cdot 10^{-3}$ Н/м.

Завдання 7. Виконати тестові завдання.

1. Дайте визначення кислотного гемолізу:

- a) руйнування клітинної мембрани еритроцитів за умов дії ультрафіолету;
- b) руйнування клітинної мембрани еритроцитів за умов дії антибіотика;
- c) руйнування клітинної мембрани еритроцитів за умов дії гемолітика;
- d) порушення структури мембрани еритроцитів в результаті утворення ліпід-білкових зшивок.

2. Від чого залежить ступінь стійкості еритроцитів:

- a) концентрації гемолітика;
- b) віку еритроцитів, концентрації гемолітика, температурних умов;
- c) концентрації гемолітика, температурних умов?

3. Дайте визначення інтегральної еритрограми:

- a) відображає убуючий відсоток гемолізованих еритроцитів, має S-подібний вигляд;
- b) відображає зміну з часом відсотка гемолізованих протягом визначеного проміжку часу еритроцитів від загального їх числа;
- c) відображає наростаючий відсоток гемолізованих еритроцитів, має S-подібний вигляд.

4. Крива розподілу еритроцитів за стійкістю називається:

- a) розподіл за стійкістю;
- b) нормальний розподіл;
- c) еритрограма;
- d) гістограма.

5. Чому після впливу температурного чинника зменшується стійкість еритроцитів до дії гемолітика:

- a) за умов високих температур відбувається денатурація мембранних білків, що послаблює мембрану в цілому;
- b) температурні умови ніяк не впливають на стійкість еритроцитів;
- c) зменшується щільність упаковки мембранних ліпідів, порушуються білок-ліпідні взаємодії, білки більше схильні до дії гемолітика?

6. Дайте визначення диференціальної еритрограми:

- a) відображає убуючий відсоток гемолізованих еритроцитів, має S-подібний вигляд;
- b) відображає зміну в часі відсотка гемолізованих протягом визначеного часу еритроцитів від загального їх числа;
- c) відображає наростаючий відсоток гемолізованих еритроцитів, має S-подібний вигляд.

7. На які структурні компоненти еритроцитів спрямована дія гемолітика:

- a) гемоглобін;
- b) плазматична мембрана;
- c) білки плазматичної мембрани;
- d) ліпіди плазматичної мембрани?

8. Виберіть неправильне твердження про властивості клітинної мембрани:

- a) ліпіди спонтанно утворюють бішар;
- b) мембранні ліпіди і білки дифундують у площині мембрани;
- c) обидві сторони мембрани ідентичні одна одній і симетричні;
- d) в різних ділянках ліпідного бішару мембрани мають різну густину.

9. Ліпіди в складі клітинної мембрани знаходяться в стані:

- a) твердому аморфному стані;
- b) твердокристалічному стані;
- c) рідкому аморфному стані;
- d) рідкокристалічному стані.

10. Яка область біомембрани має полярні і гідрофільні властивості:

- a) жирнокислотні залишки фосфоліпідів;
- b) білки;
- c) вуглеводи;
- d) головки фосфоліпідів?

11. Яка область біомембрани має неполярні і гідрофобні властивості:

- a) вуглеводи;
- b) білки;
- c) жирнокислотні залишки фосфоліпідів;
- d) головки фосфоліпідів?

12. Який за осмолярністю зовнішній розчин буде викликати гемоліз клітин:

- a) гіпотонічний;
- b) гіпертонічний;
- c) ізотонічний;
- d) платонічний?

Контрольні питання

1. Який зв'язок між світлопропусканням і оптичною щільністю?

2. Якими параметрами можна схарактеризувати диференціальну кислотну еритрограму? На що вони вказують?

3. Описати процес гемолізу. Чому в його ході змінюється оптична щільність?

4. Який механізм пошкодження мембран еритроцитів за умов дії фізичних чинників, враховуючи розподіл еритроцитів за віком? Схарактеризуйте отримані еритрограми.

3. Яке значення концентрації розчину NaCl є фізіологічно сприятливим для утримання еритроцитів крові людини *in vitro*?

5. Як зміна концентрації розчину NaCl (зростання або зменшення від фізіологічних значень) вплине на транспорт молекул води через мембрану еритроциту?

Рекомендована література

1. Ivanov I. T. Low pH-induced hemolysis of erythrocytes is related to the entry of the acid into cytosole and oxidative stress on cellular membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1999. Vol. 1415. 349-360.

2. Визначення кислотної резистентності еритроцитів. Дослідження крові тварин та клінічна інтерпретація отриманих результатів : методичні рекомендації / уклад. В. І. Левченко, В. М. Соколюк, В. М. Безух та ін. Біла Церква, 2002. С. 10–11.

3. Гарбузова В. Ю. Фізіологія еритроцитів. Фізіологія крові : навч. посібник. Суми : СумДУ, 2007. С. 26–48.

Лабораторна робота № 14



ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ УЛЬТРАФІОЛЕТОВОГО ОПРОМІНЕННЯ НА ПОВЕРХНЕВИЙ НАТЯГ ЛІПІДНИХ ПЛІВОК

Мета роботи: дослідити вплив УФ-опромінення на поверхневий натяг ліпідних плівок.

Підготовка до роботи. Повторити наступні питання:

1. Поняття поверхневого натягу. Сила поверхневого натягу.
2. Поняття моношару. Утворення ліпідних моношарів на межі розділу рідина-газ. Сили міжмолекулярної взаємодії в моношарі.
3. Дія ультрафіолетового випромінювання на ліпідні молекули.

Поверхневий натяг є важливою характеристикою поверхні розділу фаз і поверхневих явищ. Він характеризує надлишок поверхневої енергії, що приходить на одиницю міжфазної поверхні. Чим більше відмінності в силі міжмолекулярних взаємодій фаз, що межують, тим більший поверхневий натяг. За температурних умов 20°C поверхневий натяг ртуті становить 485,0 мДж/м², води – 72,8 мДж/м², етанолу – 22,0 мДж/м², соняшникової олії – 33,0 мДж/м², вершків – 42,0 Дж/м², вина – 45÷55 мДж/м². Поверхневий натяг є важливим чинником багатьох технологічних процесів: флотації, просочення пористих матеріалів, нанесення покриттів, порошкової металургії, паяння та ін. Найбільш доступними для експериментального виміру поверхневого натягу є системи рідина-газ і рідина-рідина. Визначальну роль у властивостях тонких рідких плівок (мономолекулярних шарів), що утворюються на поверхні розподілу фаз, відіграють ван-дер-ваальсові взаємодії. Під **ван-дер-ваальсовими взаємодіями** розуміють взаємодії, що мають флуктуаційне електромагнітне походження. У багатьох випадках для цих взаємодій властива універсальна залежність від відстані. Так, *енергія диполь-дипольної ван-дер-ваальсової взаємодії двох атомів обернено пропорційна до відстані в шостому ступені, а для атомів і поверхні конденсованого середовища – третього*. При цьому універсальність полягає в тому, що особливості взаємодіючих частинок або тіл, тобто їх конкретні властивості, позначаються лише на значеннях відповідних коефіцієнтів, а не на вигляді функціональної залежності енергії взаємодії. Залежність ван-дер-ваальсових взаємодій від відстані обумовлює їх **короткодійний характер** і визначає радіус сфери молекулярної дії від декількох ангстрем до декількох тисяч ангстрем.

Зростання потенціалу ван-дер-ваальсових взаємодій поблизу поверхні конденсованої фази означає, що молекули в поверхневому шарі мають додаткову енергію в порівнянні з молекулами всередині рідини. Надлишок

вільної енергії ΔF , що припадає на одиницю площі поверхні розділу фаз ΔS , характеризується **коефіцієнтом поверхневого натягу** σ :

$$\sigma = \frac{\Delta F}{\Delta S}. \quad (1)$$

Часто величину σ називають просто **поверхневим натягом**. Величину σ вимірюють в Дж/м² або Н/м.

Вільну енергію утворення межі поділу можна розуміти як роботу, яку необхідно витратити на перенесення молекул рідини з об'єму (субфази) на поверхню межі поділу фаз. Сили, що діють у субфазі на певну молекулу з боку інших молекул, компенсовані, тоді як на молекулу, розташовану на поверхні поділу, діють сили тяжіння тільки з боку субфази. Дією молекул, що знаходяться над поверхнею, можна знехтувати, оскільки щільність пари у багато разів менше щільності рідини. Тому перехід молекули з глибини рідини в поверхневий шар для збільшення поверхні пов'язаний з необхідністю здійснення роботи проти діючих у поверхневому шарі сил. Ця робота здійснюється молекулою за рахунок запасу її кінетичної енергії і йде на збільшення її потенційної енергії.

Коефіцієнт поверхневого натягу рідини зменшується з ростом температури, а при критичній температурі він обертається в нуль (див. далі в тексті *Примітку 1*). Поверхневий натяг розчину σ майже завжди відрізняється від поверхневого натягу розчинника σ_0 , оскільки розчинені речовини в залежності від їх природи можуть концентруватися на поверхні розчину або переходити в об'єм розчину. Наприклад, розчинення солей призводить до збільшення коефіцієнта поверхневого натягу (див. далі в тексті *Примітку 2*). Речовини, які зменшують поверхневий натяг при адсорбції на поверхні розділу фаз, називаються **поверхнево-активними речовинами** (ПАР). ПАР щодо води є спирти, органічні кислоти, аміни та інші. Поверхнево-активні речовини здатні адсорбуватися на поверхні води, утворюючи при цьому моношари. Така властивість ПАР обумовлена особливостями їх структури: молекули разом з полярними гідрофільними групами містять неполярні вуглеводневі радикали. На поверхні води полярні групи взаємодіють з молекулами води, а гідрофобні кінці виступають у повітряний простір. Завдяки такій будові мономолекулярного шару коефіцієнт поверхневого натягу води зменшується.

На поверхні рідини мономолекулярний шар нерозчинних і слаботорозчинних ПАР може перебувати в різних «агрегатних» станах. Якщо відстань, що розділяє молекули в мономолекулярному шарі, велика в порівнянні з їх розмірами і молекули майже не взаємодіють, шар називається газоподібним (G-плівка). Мономолекулярний шар з гранично щільним упакуванням молекул називається конденсованим; його уподібнюють двомірній рідині (L-плівка) або двовимірному твердому тілу (S-плівка). У газоподібному

моношарі на межі водне середовище–газ гідрофобні групи амфіфільних молекул ПАР розташовуються уздовж поверхні поділу фаз, в конденсованих моношарах вони орієнтовані по нормалі або під кутом до міжфазної поверхні. Макромолекули в мономолекулярному шарі можуть перебувати у вигляді клубків, спіралей або інших структурних форм. Молекули лінійних полімерів зазвичай приймають плоску конформацію, розташовуючись уздовж поверхні поділу фаз. Однак окремі ділянки ланцюга можуть утворювати «петлі» і «хвости», які виступають далеко за межі поверхневого шару. Деякі макромолекули, наприклад білкові, мають в розчині форму спіралі, а при виході з об'єму фази в поверхневий шар повністю або частково розгортаються.

Структура і властивості моношарів сильно залежать від будови молекул, що їх утворюють, ступеня іонізації полярних груп, природи контактуючих фаз та інших факторів. Мономолекулярні шари, особливо S- і L-плівки, впливають на швидкість масопереносу через поверхню поділу фаз (наприклад, беруть участь у регуляції вологості шкіри людини), тертя, адгезію. Моношари деяких речовин ефективно знижують випаровування летючих нафтопродуктів, захищають метали від корозії. Стан мономолекулярного шару, його електричні і реологічні властивості вирішальним чином позначаються на стійкості емульсій та пін. Важливу роль мономолекулярні шари (ліпідні, ліпопротеїдні та інші) відіграють у мембранних процесах клітини.

ПАР виконують важливі функції в організмі людини. Наприклад, сурфактант, що вистилає альвеоли легенів зсередини, є сумішшю поверхнево-активних речовин і, перебуваючи на межі повітря–рідина в цих бульбашках, перешкоджає спаданню (злипання) стінок альвеол при диханні за рахунок зниження поверхневого натягу. Сурфактант складається з фосфоліпідів, білків і полісахаридів (див. табл. 1).

Таблиця 1

Склад легеневого сурфактанту

Фосфоліпіди: 85 %	% фосфоліпідів
Фосфатидилхолін:	7,3
дипальмітоїлфосфатидилхолін	47,0
ненасичений фосфатидилхолін	29,3
Фосфатидилгліцерол	11,6
Фосфатидилінозитол	3,9
Фосфатидилетаноламін	3,3
Сфінгомієлін	1,5
Інші	3,4
Нейтральні ліпіди 5 %	
Холестерол, свободні жирні кислоти	
Білки: 10 %	

Сурфактант також має захисну дію. Високі поверхнево-активні властивості сурфактанту пояснюються присутністю в ньому дипальмітоїлфосфатидилхоліна. Сурфактант розташовується на поверхні альвеолярного епітелію і включає 2 фази: гіпофазу (нижню), що складається з тубулярного мієліну; апофазу – поверхневу мономолекулярну плівку фосфоліпідів, звернену в порожнину альвеоли гідрофобними ділянками.

Сльоза, розподіляючись на поверхні ока, являє якусь подобу шару або плівки. Оскільки поверхня рогівки сама по собі не є постійною (за рахунок злущування епітелію), слізна плівка (СП) згладжує нерівності в ній і створює поверхню заломлення з бездоганною оптичною характеристикою. Крім того, СП потрібна для підтримки адекватного метаболізму рогівки і кон'юнктивального епітелію. Кисень, розчинений в СП, забезпечує адекватне дихання поверхневого епітелію очей. СП також відіграє роль мастила при русі повік і містить антибактеріальні субстанції (лізоцим, лактоферин, церулоплазмін, β -лізин, секреторний імуноглобулін А та ін.), що забезпечує значну стійкість зовнішньої поверхні ока до шкідливої дії різних інфекційних агентів. СП являє собою тришаровий меніск (рис. 1), що складається з шару ліпідів, водного шару і шару муцину.

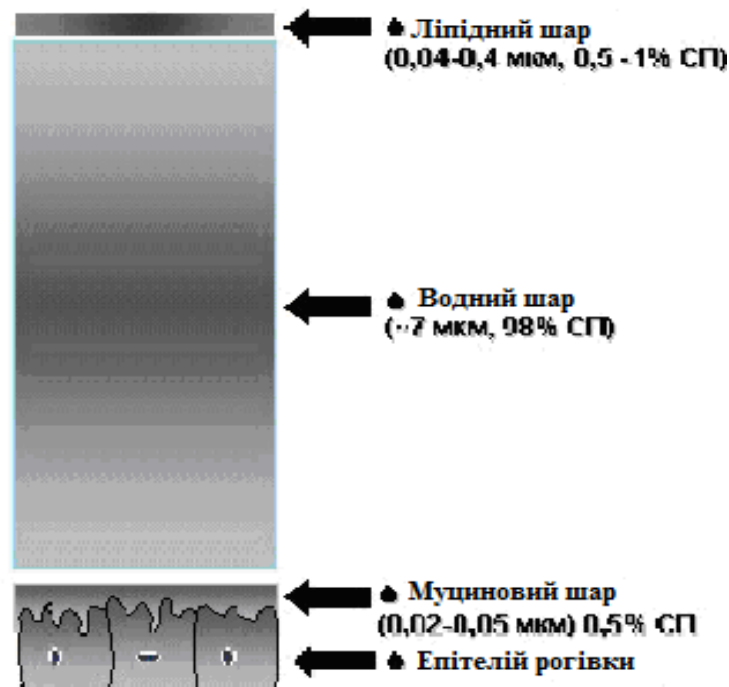


Рис. 1. Будова слізної плівки

Зовнішній шар СП представлений, в основному, ліпідами, які є продуктами мейбомієвих залоз повік. Він складається переважно з фосфоліпідів, нейтрального жиру і ефірів холестерину, які розчиняються при температурі тіла людини. Шар ліпідів регулює ступінь випаровування середнього водного шару, а також спільно з поверхнево-активними білками водного шару бере участь у регуляції поверхневого натягу СП, представ-

ляючи собою подобу біологічної мембрани. Як у будь-якій біологічній мембрані, ліпіди, особливо холестерин і фосфоліпіди, забезпечують проникність і пластичність мембрани.

Середній водний шар – завтовшки 7 мкм – займає майже 90 % товщини всієї слізної плівки і формується, в основному, за рахунок секреції додаткових слізних залозок Генле, Манца, Краузе, Вальдєєра, Уолфрінга. Водний шар має низьку в'язкість і включає всі водорозчинні компоненти сльози – неорганічні солі, глюкозу, сечовину, протеїни, глікопротеїди та ін. У слізній плівці знайдено близько 11 білкових компонентів з молекулярною масою від 16000 до 400000 дальтон. Проте найбільш часто в слізній плівці знаходять 4 білки: лізоцим, лактоферин, β -лізин і секреторний імуноглобулін. Білки слізної плівки беруть участь у процесах регуляції поверхневого натягу слізної плівки, підтримки буферної ємності, захисних і трофічних процесах ока. Глюкоза, розчинена в слізній плівці, є головним компонентом енергетичного обміну рогівки. Внутрішній шар слізної плівки (шар муцину) представлений кислими мукополісахаридами (глікозаміногліканами), що знаходяться в гелевій та сольовій формах. Джерелом надходження муцину є келихоподібні клітини Бехера кон'юнктиви. Полярний муцин знаходиться в стані, який не дозволяє йому адгезуватися на поверхні рогівкового епітелію. Розподіляючись у вигляді моношару на мікроворсинках епітеліальної поверхні ока, муцин згладжує всі нерівності, властиві такій поверхні. Більше того, муцин є своєрідним детергентом гідрофобного епітелію рогівки по відношенню до середнього водного шару СП. В результаті такого впливу первинно гідрофобний рогівковий епітелій перетворюється в гідрофільний, сприяючи, таким чином, надходженню поживних речовин з водного шару СП до епітелію поверхні ока. Нова, сформована після чергового моргання, слізна плівка має товщину 6-10 мкм, осмолярність 300 мОсм/л при рН $7,0 \div 7,3$ і питомій щільності $1001 \div 1008 \text{ кг/м}^3$.

Дослідження **моношарів** дає інформацію про такі фізичні параметри індивідуальних речовин, як поверхневий тиск моношару ($\Delta\sigma = \sigma_0 - \sigma$, де σ_0 , σ – поверхневий натяг для чистої води і після адсорбції ПАР на межі поділу, відповідно), молекулярна площа речовини в моношарі, залежність поверхневого тиску від молекулярної площі. Для оцінки величини поверхневого натягу найбільш часто використовують статичні або полустатичні методи, що дозволяють вимірювати рівноважні значення поверхневого натягу рідин. До статичних відносяться методи капілярного підняття рідини і висячої (лежачої) краплі. Полустатичними є методи максимального тиску в краплі (бульбашці), відриву кільця або пластини і сталагмометричний метод. Найбільш часто для визначення поверхневого натягу застосовують такі методи: найбільшого тиску, сталагмометричний, відриву кільця і врівноваження пластинки (метод Вільгельмі).

Метод найбільшого тиску заснований на продавлюванні бульбашки газу або повітря під впливом зовнішнього тиску p через калібрований капіляр радіусом r_0 (рис. 2, а). Зі збільшенням тиску бульбашка росте, а радіус кривизни її поверхні R перевищує радіус капіляра (положення 1: $R > r_0$). Подальше збільшення об'єму бульбашки відбуватиметься до тих пір, поки внутрішній тиск досягне свого максимального значення; радіус кривизни при цьому буде мінімальним, тобто $R = r_0$ (положення 2).

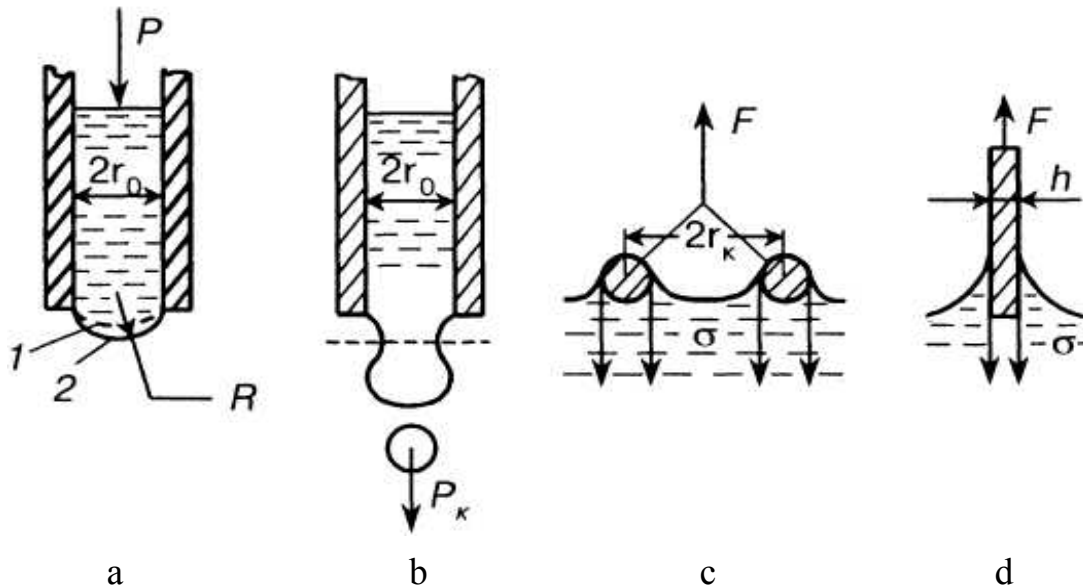


Рис. 2. Методи визначення поверхневого натягу:
а – найбільшого тиску; б – сталагмометричний;
с – відриву кільця; д – врівноваження пластинки

У цей момент бульбашка втратить стійкість: при збільшенні її об'єму вона відривається від капіляра. Якщо в момент відриву бульбашки виміряти тиск p , то поверхневий натяг можна виразити таким чином:

$$p = \frac{2\sigma}{r_0} \rightarrow \sigma = \frac{pr_0}{2}. \quad (2)$$

Для того щоб не вимірювати радіус капіляра, можна визначити p еталонної рідини, поверхневий натяг якої відомий, наприклад води. Тоді замість формули (2) можна записати

$$\sigma = \sigma_{H_2O} \frac{p}{p_{H_2O}}. \quad (3)$$

У **сталагмометричному методі** визначають вагу краплі, яка відривається від капіляра (рис. 2, б) під дією сили тяжіння або в результаті видавлювання мікрошприцом. Наближено вважають, що при відриві вага

краплі P_i врівноважується силою, яка дорівнює поверхневому натягу, помноженому на довжину окружності капіляра радіусом r_0 , тобто

$$F = 2\pi \frac{r_0 \cdot \sigma}{k} \rightarrow \sigma = \frac{F \cdot k}{2\pi r_0}, \quad (4)$$

$$\sigma = k m, \quad (5)$$

де k – постійна сталагмометра; m – маса однієї краплі.

При вимірюванні поверхневого натягу методом максимального тиску і сталагмометричним методом бульбашка і крапля формуються порівняно швидко за час, недостатній для утворення адсорбційного шару розчинених молекул ПАР, особливо якщо вони мають порівняно велику молекулярну масу. У цих умовах не встигає встановитися рівноважний поверхневий натяг. Для подібних розчинів рекомендується збільшувати час формування бульбашки або краплі до тих пір, поки тиск або число крапель стануть постійними.

У **методі врівноваження пластинки** (або методі Вільгельмі) визначають силу F , необхідну для вилучення з рідини зануреної в неї тонкої пластинки завширшки h (рис. 2, г):

$$F = 2\sigma h. \quad (6)$$

Метод відриву кільця (рис. 2, в) заснований на тому, що поверхневий натяг можна визначити як силу, що діє на одиницю довжини контуру поверхні поділу фаз і прагне скоротити цю поверхню до мінімуму. Направлена сила поверхневого натягу по дотичній до поверхні рідини, перпендикулярно до ділянки контуру, на який вона діє.

Величину поверхневого натягу експериментально можна визначити за силою відриву кільця, що утворює контур за формулою:

$$\sigma = \frac{P - P_0}{2\pi r}, \quad (7)$$

де P – вага кільця, Н, яка вимірюється в момент відриву; P_0 – абсолютна вага кільця, Н; r – зовнішній радіус кільця, м.

Оскільки ваги відградуєвані в одиницях маси, тому формулу (7) зручно привести до виду:

$$\sigma = \frac{g(m - m_0)}{2\pi r}, \quad (7a)$$

де g – прискорення вільного падіння, дорівнює $9,81 \text{ м/с}^2$; m і m_0 – показання ваг у момент відриву кільця і абсолютна маса кільця, відповідно, кг.

Вимірювання поверхневого натягу рідин методом відриву кільця проводиться за допомогою торсіонних ваг. Для цього легке металеве кільце, підвішене до торсійних ваг, наводиться в зіткнення з поверхнею досліджуваної рідини. Потім збільшують силу натягу підвіски, повільно поверта-

ючи важіль натягу, і фіксують показання ваг у момент відриву кільця. Значення сили в момент відриву кільця пропорційне поверхневому натягу.

Примітка 1. Поверхневий натяг зменшується при зростанні температури. Для багатьох рідин виконується наступна емпірична формула:

$$-\frac{d}{dT} = \left[\sigma \left(\frac{M}{\rho} \right)^{\frac{2}{3}} \right] = 2,12,$$

де M – молекулярна вага; ρ – щільність; T – температура.

Поверхневий натяг для розділу фаз рідина – повітря

$T, ^\circ\text{C}$	$\sigma, \text{мДж/м}^2$			
	Вода	спирт етиловий	ацетон	гліцерин
0	75,7	24,1	–	
10	74,2	23,6	–	
15	73,5	–	–	
20	72,75	22,8	23,7	59,4
25	72,0	–	–	–
30	71,2	21,9	–	59,0
40	69,6	–	–	58,5
50	67,9	–	20,0	58,0
60	66,2	–	–	57,4
70	64,4	–	–	
80	62,8	–	–	
100	58,8	–	–	

Примітка 2. Поверхневий натяг водних розчинів солей концентрації M підпорядковується наступній залежності:

$$\sigma = \sigma_{\text{H}_2\text{O}} + M \Delta\sigma,$$

де $\Delta\sigma$ – зміна σ для розчину, концентрація якого дорівнює 1 г-екв/л.

сіль	$\Delta\sigma$ при 20°C
KCl	1,40
NaCl	1,64

Виконання роботи

Лабораторне обладнання та матеріали: торсіонні ваги ВТ-500, УФ лампа, металеве кільце, чашки Петрі, скляна паличка; дистильована вода, гліцерин, етанол, лінетол.

Завдання 1. Визначення поверхневого натягу води.

1. Підготувати торсіонні ваги для проведення вимірювань. Для цього ваги встановлюють за допомогою опорних гвинтів так, щоб бульбашка

рівня була відцентрована. Ретельно очищене металеве кільце підвішують за дужку на гачок коромисла торсійних ваг. Чисту чашку заповнюють дистильованою водою і встановлюють її на підйомному столику.

2. За допомогою підйомного механізму підняти чашку до тих пір, поки поверхня рідини не стикнеться з кільцем, але не допускати утоплення кільця. Показчик ваги встановити в початок шкали, пересунути закріпний важіль – *аретир* – у положення «ВІЛЬНО» і повільно повертати важіль натягу проти годинникової стрілки. Протягом цієї операції необхідно постійно стежити за розташуванням кільця і зупиняти рух точно в момент відриву кільця від поверхні рідини. Записати показання ваг. (У тому випадку, якщо величина сили відриву кільця виходить за межу шкали ваг, то за допомогою тарувального гвинта, розташованого на задній стінці корпусу ваг, можна змістити початок відліку і тим самим отримати можливість провести зміни. При подальших вимірах положення тарувального гвинта змінювати вже не можна.)

3. Трохи опустити підйомний столик і провести зважування кільця для визначення m_0 . Для отримання даних під час зважування необхідно пересувати важіль натягу тільки проти годинникової стрілки і не дуже швидко, намагаючись не допускати відхилення стрілки показника рівноваги (в нижній частині циферблата) вправо від межі рівноваги. *Показчик маси повертається до нуля поворотом важеля натягу за годинниковою стрілкою при закріпленому аретирі.*

Виконати 4–5 вимірювань (пп. 2 і 3), знайти середні значення $\bar{m}$ і $\bar{m}_0$, оцінити середню квадратичну похибку показань ваг.

Середнє значення показань ваг у момент відриву:

$$\bar{m} = \frac{\sum_{i=1}^n m_i}{n},$$

середня квадратична похибка показань ваг:

$$S(m) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n |\bar{m} - m_i|^2}{n(n-1)}}.$$

Розрахувати $\bar{\sigma}$ і порівняти з табличним значенням σ для води при даній температурі.

	1	2	3	4	5	Середнє значення
m						
m_0						

Завдання 2. Проведення градуювання торсіонних ваг.

1. Визначення поверхневого натягу різних рідин проводять також по вимірюванню сили відриву кільця від поверхні досліджуваної рідини. Однак через різні змочування і відхилення від ідеальної геометрії кільця застосування формули (7 або 7а) для розрахунку σ обмежено. Тому при отриманні значення σ більш зручно скористатися *градуванням торсіонних ваг*. Для отримання градуювання необхідно виміряти силу відриву кільця від поверхні еталонних рідин і побудувати графік залежності табличних значень поверхневого натягу еталонних рідин від отриманих показань торсіонних ваг. Вважаючи, що така залежність повинна мати лінійний характер, значення поверхневого натягу σ_x невідомої рідини виражається як

$$\sigma_x = \sigma_1 + \frac{\sigma_2 - \sigma_1}{P_2 - P_1} \cdot (P_x - P_1) \quad (8)$$

або

$$\sigma_x = \sigma_1 + \frac{\sigma_2 - \sigma_1}{m_2 - m_1} \cdot (m_x - m_1), \quad (8a)$$

де σ_1 і σ_2 – табличні значення поверхневого натягу еталонних рідин (наприклад, води і етанолу); P_1 , P_2 , P_x і m_1 , m_2 , m_x – сила відриву кільця або значення показань ваг у момент відриву для двох еталонних і досліджуваної рідин, відповідно.

2. При проведенні градуювання торсіонних ваг виміряти 4–5 разів силу відриву кільця для пропонованих еталонних рідин, результати експериментів занести в таблицю, отримати середні значення і за середніми значеннями побудувати графік градуювальної залежності.

Еталонна рідина	Сила відриву кільця					Середнє значення
	1	2	3	4	5	
Вода						
Спирт						
Гліцерин						

Завдання 3. Вивчення впливу різних режимів УФ-опромінення на поверхневий натяг лінетолових плівок.

1. Сформувати три зразки лінетолових плівок на поверхні води (лінетол, що отримується з льняного масла, є сумішшю етилових ефірів ненасичених жирних кислот). Для цього скляною паличкою, змоченою в лінетолі, злегка торкаються поверхні води. Під час розтікання змінюється колір плівки, набуваючи райдужні тони. Це свідчить про те, що товщина плівки порівнянна з відповідною довжиною хвилі світла. Формування плівки можна вважати закінченим, коли розтікання припиняється, а поверхня

плівки забарвлюється в однотонний сірий колір. Процес може тривати близько 10–15 хв. Слід зазначити, що при великій кількості ліпиду, перенесеного на поверхню води, він не розтікається по поверхні, а залишається у вигляді крапельки.

2. Виміряти поверхневий натяг для отриманих зразків плівок і визначити середнє значення. При великому розкиді значень слід провести повторне формування плівок і вимір поверхневого натягу. Після кожного вимірювання обполоснути кільце в розчині №1 і акуратно промокнути фільтрувальним папером для видалення залишків розчину. Потім сполоснути його в розчині №2 і знову промокнути фільтрувальним папером.

3. Для вивчення впливу ультрафіолетового опромінювання провести наступні експерименти:

а) сформувати на воді 3 ліпідні плівки, опромінити їх протягом 5, 10 і 15 хвилин під ультрафіолетовою лампою і виміряти поверхневий натяг зразків плівок;

б) помістити на 3 предметні стекла по краплині лінетолу і опромінити протягом 5, 10 і 15 хвилин, сформувати з них на поверхні води плівки і виміряти їх поверхневий натяг;

в) результати експериментів занести в таблицю.

Час опромінення, хв.	Поверхневий натяг, мДж/м ²					
	Плівка лінетолу на воді			Лінетол в краплі		
	1	2	3	1	2	3
0						
5						
10						
15						

Завдання 4. Зробити висновки.

Завдання 5. Розв'язати задачі.

1. Невелика комаха сидить на поверхні води, утворюючи контакт у вигляді круга площею 0,15 см². Яку масу повинна мати комаха, щоб вона вільно утримувалась на поверхні води? (Коефіцієнт поверхневого натягу води 72,6 мН/м.)

2. У капілярі діаметром 1,4 мм вода піднімається на висоту 1,4 см. Яка буде висота підняття води і на скільки зміняться змочувальні властивості капіляра, якщо після обробки його крайовий кут дорівнює 60°?

3. Інтактну клітину стискають тонкою пластинкою $m=0,01$ мг. Площа клітини, на яку тисне пластинка, становить 0,01 мм². Під впливом стискування клітина набуває форми еліпсоїда з радіусами 160 і 240 мкм. Визначити коефіцієнт поверхневого натягу клітини.

4. Розрахувати додатковий тиск, зумовлений поверхневим натягом у краплині рідини ($\sigma=72,6 \text{ мН}\cdot\text{м}^{-1}$), якщо вона має сферичну форму діаметром 3 мкм.

5. Судини ксилеми мають радіус 20 мкм. На яку висоту підніматиметься вода по ксилемі? Прийняти $\sigma=72,8\cdot 10^{-3} \text{ Н}\cdot\text{м}^{-1}$ і $\rho=998 \text{ кг}\cdot\text{м}^{-3}$. Який радіус повинні мати судини, щоб вода за рахунок капілярних сил досягала вершини дерева заввишки 20 м?

Завдання 6. Виконати тестові завдання.

1. Поверхневий натяг – це:

- а) прагнення речовини зменшити надлишок своєї потенційної енергії на межі розділу з іншою фазою;
- б) прагнення речовини збільшити свою потенційну енергію на межі розділу з іншою фазою;
- в) прагнення речовини зменшити надлишок своєї кінетичної енергії на межі розділу з іншою фазою;
- г) прагнення речовини збільшити свою кінетичну енергію на межі розділу з іншою фазою.

2. Одиниця виміру поверхневого натягу:

- а) Дж/кг;
- б) Н/м;
- в) Дж/м;
- г) Дін/см².

3. Дайте визначення коефіцієнта поверхневого натягу:

- а) дорівнює відношенню сили поверхневого натягу до довжини контуру рідини, на яку діє ця сила;
- б) дорівнює відношенню довжини контуру рідини до площі;
- в) дорівнює відношенню сили поверхневого натягу до площі рідини;
- г) дорівнює відношенню площі рідини до сили поверхневого натягу.

4. Метод «відриву кільця» – це:

- а) спосіб оцінки ефективності міжмолекулярних взаємодій у поверхневому шарі;
- б) спосіб оцінки в'язкості рідини в поверхневому шарі;
- в) спосіб оцінки величини поверхневого натягу рідини;
- г) спосіб оцінки міцності осі, на якій тримається кільце.

5. Термодинамічно вигідна форма локалізації молекул на поверхні води, звернених гідрофільною областю в воду, а гідрофобною – в повітря:

- а) мономолекулярний шар;
- б) мономолекулярний шар ліпідів;
- в) мономолекулярний шар жирних кислот;
- г) ліпідна везикула.

6. Речовини, що адсорбуються з рідини на поверхню розділу фаз рідина–повітря і сприяють зменшенню величини поверхневого натягу:

- a) жирні кислоти;
- b) поверхнево-активні речовини;
- c) мономолекулярний шар ліпідів;
- d) поверхнево-активні жирні кислоти.

7. Яким чином можна регулювати величину поверхневого натягу на межі поділу фаз рідина–повітря:

- a) зміною атмосферного тиску;
- b) зміною атмосферного тиску і концентрації поверхнево-активних речовин;
- c) зміною концентрації поверхнево-активних речовин;
- d) дана величина ніяк не регулюється?

8. Як ультрафіолетове опромінення впливає на величину поверхневого натягу ліпідних плівок:

- a) зменшує поверхневий натяг;
- b) збільшує поверхневий натяг;
- c) наближає до величини поверхневого натягу води;
- d) не змінює поверхневий натяг?

9. Виникнення надлишкової поверхневої енергії можливо за рахунок:

- a) зростання потенціалу ван-дер-ваальсових взаємодій поблизу поверхні;
- b) зменшення потенціалу кулонівських взаємодій поблизу поверхні;
- c) зростання потенціалу ковалентних взаємодій поблизу поверхні;
- d) зростання потенціалу ковалентних і ван-дер-ваальсових взаємодій поблизу поверхні.

10. Як залежить коефіцієнт поверхневого натягу від температури рідини:

- a) зменшується зі збільшенням температури;
- b) збільшується зі збільшенням температури;
- c) зменшується зі зменшенням температури;
- d) не змінюється?

Контрольні питання

1. Описати структуру моно- або мультимолекулярних плівок на основі лінетолу.

2. Як змінюється поверхневий натяг при утворенні молекулярних структур на поверхні води?

3. Яка причина виникнення надлишкової поверхневої енергії?

4. Що називається поверхневим натягом? В яких одиницях він вимірюється?

5. Від чого залежить величина поверхневого натягу?

6. Які речовини називають поверхнево-активними? Наведіть приклади поверхнево-активних речовин.

7. Дайте характеристику ліпідного моношару.

8. Які методи вимірювання поверхневого натягу ви знаєте?

9. Основні положення методу «відриву кільця».

Додаткова література

1. Костюк П. Г., Зима В. Л., Магура І. С., Мірошніченко М. С., Шуба М. Ф. Біофізика / за ред. П. Г. Костюка. Київ : Обереги. 2001. 544 с.

2. Остапченко Л. І., Михайлик І. В. Біологічні мембрани: методи дослідження структури і функцій : навч. посіб. К. : Київський університет, 2006. 215 с.

3. Курский М. Д., Кучеренко М. Є. Біомембранологія : навч. посібник. К. : Вища шк., 1993. 260 с.: іл.

4. Мчедлов-Петросян М. О., Лебідь В. І., Глазкова О. М., Лебідь О. В. Колоїдна хімія : підручник. Харків : ХНУ імені В. Н. Каразіна, 2012. 500 с.

5. Introduction to Biomolecular Structure and Biophysics. Basics of Biophysics. Edited by Gauri Misra. Springer. 2017. 294 p.

6. Ahmad S. I. Biological Effects of Ultraviolet Radiation (Advances in Experimental Medicine and Biology, 996). Springer. 2017. 389 p.

Для нотаток

Навчальне видання

Берест Володимир Петрович
Січевська Лариса Вікторівна
Жигалова Наталія Миколаївна

БІОФІЗИЧНИЙ ПРАКТИКУМ

Навчальний посібник

Коректор *О. В. Анцибора*
Комп'ютерне верстання *В. В. Савінкова*
Макет обкладинки *І. М. Дончик*

Формат 60x84/16. Ум. друк. арк. 5,7. Наклад 100 пр. Зам. № 321/24.

Видавець і виготовлювач
Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна,
61022, м. Харків, майдан Свободи, 4.
Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 3367 від 13.01.2009
Видавництво ХНУ імені В. Н. Каразіна