

Лабораторная работа №1

**ВЫДЕЛЕНИЕ ЭЛЕМЕНТОВ КЛЕТОК МЕТОДОМ
ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОГО ЦЕНТРИФУГИРОВАНИЯ**

Цель работы: методом дифференциального центрифугирования получить органеллы клеток печени.

Необходимое оборудование, принадлежности и материалы: центрифуга, пробирки центрифужные, химические стаканы, реактивы: сахароза, трис(HCl), ЭДТА, навеска печени, гомогенизатор, марля медицинская, весы центрифужные.

Подготовка к работе.

Повторить следующие вопросы.

1. Понятие центробежного ускорения.
2. Силы, действующие на частицу при седиментации.

Центрифугирование применяется для разделения мелкодисперсных многокомпонентных смесей, а также для фракционирования клеточных органелл и определения молекулярного веса высокомолекулярных органических соединений, например белков, нуклеиновых кислот (седиментационный анализ).

Принцип метода. Разделение веществ с помощью центрифугирования основано на том, что в центробежном поле частицы, имеющие различные размеры, форму и плотность, осаждаются (седиментируют) с разной скоростью.

Величина центробежной силы определяется скоростью вращения ротора и расстоянием от оси вращения. Для сравнения условий центрифугирования на разных центрифугах принято указывать относительное центробежное ускорение (фактор разделения), выраженное в ***g*** ($g=9,8 \text{ м} \cdot \text{с}^{-2}$), которое для единичной массы можно рассчитать по формуле:

$$f = 1,118 \cdot 10^{-3} \cdot r \cdot N^2$$

где ***f*** — фактор разделения; ***r*** — радиус, м; ***N*** - число оборотов ротора в минуту. Для примерных расчетов фактора разделения обычно пользуются номограммами или таблицами, которые прилагаются к каждому ротору.

Расчет времени оседания частиц проводят по уравнению Стокса, видоизмененному Сведбергом и Николсом:

$$t = K \frac{\eta \lg \frac{x_2}{x_1}}{N^2 a^2 (d_p - d_m)}$$

где ***d_p*** и ***d_m*** — удельный вес частицы и жидкости, соответственно; ***a*** -

радиус частицы; t — время; η — вязкость жидкости; x_1 и x_2 — начальный и конечный радиусы вращения; K — константа (для частиц шарообразной формы $K=946$).

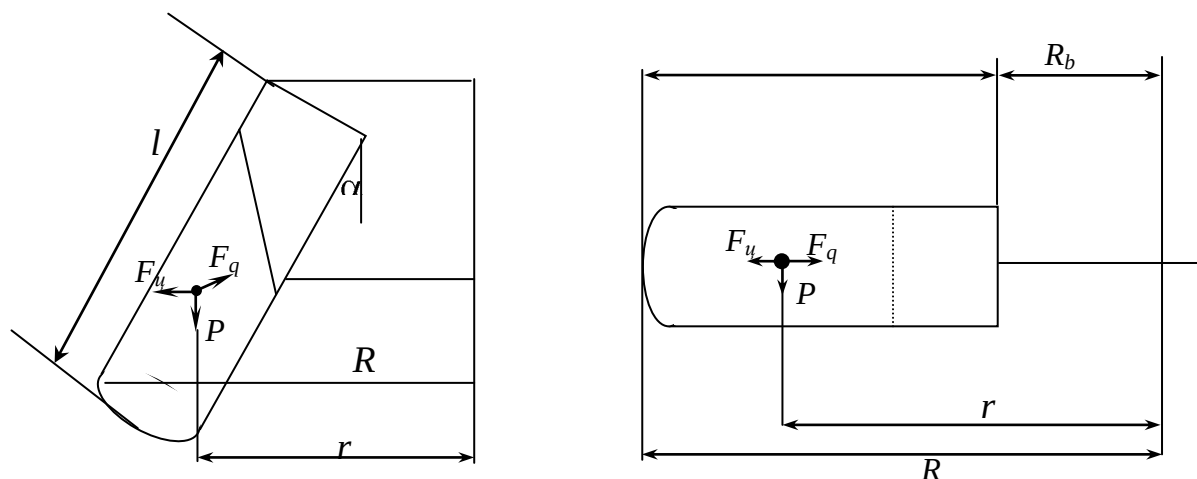


Рис. 1. Диаграммы сил, действующих на частицу при центрифугировании: *а* — роторы углового типа; *б* - с подвесными стаканами – бакет.

В зависимости от задач, стоящих перед исследователем, центрифугирование можно условно разделить на препаративное и аналитическое (седиментационный анализ).

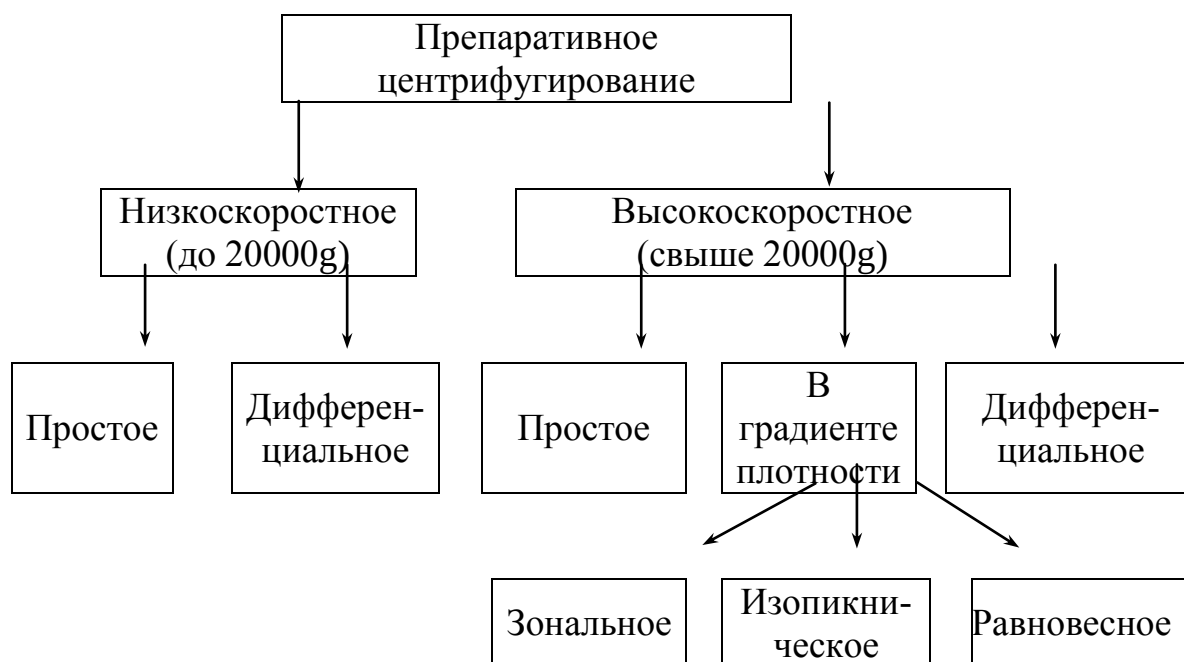


Рис. 2. Классификация методов препаративного центрифугирования.

Разделение клеточных органелл дифференциальным центрифугированием.

Для дифференциального центрифугирования используются различные типы роторов, в зависимости от объемов и требуемого фактора разделения. При дифференциальном центрифугировании первыми

осаждаются клеточные компоненты с наибольшей массой (т.е. целые клетки и ядра), а последними — с наименьшей (т.е. микровезикулы). Центрифугирование при факторах разделения до **20000g** можно проводить в стеклянных пробирках, при более высоких значениях фактора разделения применяют пробирки из синтетических материалов: полиэтилен, поликарбонат, нитроцеллюлоза и др.

Центрифугирование. Исследуемую взвесь или коллоидный раствор наливают в пробирку, которую после уравнивания с точностью до 1 мг и удаления пузырьков воздуха (при использовании герметичных роторов углового типа) помещают в установленный на валу привода центрифуги ротор и центрифугируют при первом выбранном факторе разделения, что необходимо для осаждения самых тяжелых частиц.

Получить чистый препарат за одно центрифугирование практически невозможно. Первый образовавшийся осадок содержит кроме самых тяжелых частиц некоторое количество других компонентов разделяемой смеси. После седиментации его ресуспандируют в среде, состав которой определен задачами работы, и снова центрифугируют при тех же условиях (промывка).

Эту процедуру проводят для получения чистых осадков несколько раз. Полученные супернатанты (надосадочные жидкости) объединяют для дальнейшего разделения. Объединенный супернатант центрифугируют при втором факторе разделения для осаждения более мелких частиц. Далее, также ступенчато повышают фактор разделения до тех пор пока не получают осадок последнего компонента изучаемой смеси. После этого супернатант, проверенный на полноту осаждения, можно отбросить, в случае необходимости, исследовать, исходя из задач эксперимента. Ступени относительного центробежного ускорения в большинстве случаев подбирают экспериментально применительно к среде гомогенизации и объекту исследования. Большая дискретность ступеней фактора разделения обеспечивает получение более чистых препаратов. Однако достигнуть высокой чистоты практически не удастся из-за относительно близких размеров частиц. Для улучшения очистки используют центрифугирование в градиентах плотности сахарозы, фиколла, декстрана и других веществ.

Применение дифференциального центрифугирования для разделения клеточных органелл

Компонент	Условия центрифугирования	
	Фактор разделения, g	Время, мин.
Клеточные стенки	500-750	10
Ядра	500-1000	10-20
Митохондрии	9000-18000	10-20
Общие микросомы	80000-100000	30-90

Разделение фракций в градиентах плотности.

Существуют два вида градиентов плотности веществ: непрерывный и ступенчатый. Градиент должен охватывать диапазон плотностей изучаемого материала и несколько перекрывать его. Ступенчатые градиенты можно разделить на простые (2-3 слоя растворов разной плотности) и сложные (более 3 слоев). Чем больше слоев, тем ближе ступенчатый градиент приближается к непрерывному. Широкое распространение ступенчатые градиенты получили из-за простоты их приготовления, а также возможности получения больших количеств исследуемой фракции. Наносят их пипеткой или шприцем, наслаивая раствор с меньшей плотностью на раствор с большей плотностью. Формирование непрерывных градиентов осуществляется автоматически с помощью специальных установок.

Способы центрифугирования в градиентах плотности.

Скоростное зональное центрифугирование (s-зональное) применяют для разделения частиц по размеру. Его проводят с использованием линейного градиента плотности. Изучаемую смесь наносят на поверхность градиента и центрифугируют при максимально возможном для данного типа ротора факторе разделения 20—30 мин до получения дискретных зон или полос исследуемых фракций. Наличие градиента препятствует конвекционному смешиванию этих зон. Если разделение не достигнуто, то увеличивают время центрифугирования или фактор разделения (применяя другой ротор). Если все частицы осели на дно, то увеличивают плотность градиента или уменьшают фактор разделения.

Изопикническое центрифугирования в основе которого лежит разделение частиц в зависимости от их плавучей плотности. Плавучая плотность вещества определяется соотношением формы, размеров и удельной плотности разделяемых веществ, а также плотностью жидкого компонента, т. е. можно подобрать среду центрифугирования и фактор разделения так, что центробежная сила будет уравновешена силой диффузии и выделяемый компонент смеси не будет осаждаться на дно пробирки. Такое равновесное состояние называется ***изопикнической точкой***. Плавучая плотность компонента в изопикнической точке совпадает с плотностью раствора.

Равновесная плавучая плотность отличается от истинной плотности исследуемых частиц и зависит от способности раствора градиента проникать внутрь везикулы. Биологические мембраны проницаемы для небольших молекул сахарозы и равновесная плотность пузырьков в сахарозном градиенте определяется главным образом самим объектом и связанной с ним водой. В градиенте фикола, декстрана и других высокомолекулярных веществ, не проникающих внутрь везикул, плавучая

плотность частиц существенно ниже, чем в сахарозе. Достижение изопикнической точки — длительный процесс.

Существуют два вида изопикнического центрифугирования: без градиента плотности и с градиентом. В первом случае сначала удаляют тяжелые частицы, затем осаждают исследуемую фракцию. Осадок ресуспендируют в среде, плотность которой совпадает с плавучей плотностью фракции, и центрифугируют до тех пор, пока исследуемые частицы не осядут на дно, а частицы с меньшей плотностью не всплывут.

Зонально-изопикническое центрифугирование - наиболее распространенный способ изопикнического центрифугирования. В этом случае образец наносят на поверхность линейного или ступенчатого градиента концентрации сахарозы, фикола или другого специально подобранного вещества, охватывающего все плавучие плотности компонентов исследуемой смеси, и центрифугируют до тех пор, пока каждый компонент не окажется в своей изопикнической точке. Этот метод требует более длительного центрифугирования (более часа), но позволяет с высокой степенью разрешения разделить несколько компонентов по их плавучим плотностям.

Флотация - разновидность изопикнического центрифугирования, основанная на всплывании исследуемого компонента. При проведении разделения этим методом образец ресуспендируют в растворе с большей плотностью, помещают его на дно пробирки, затем наслаивают раствор с меньшей плотностью, причем изопикническая точка должна располагаться в средней части пробирки. Центрифугирование проводят до тех пор, пока изучаемый компонент не всплывет в зону равновесной плотности.

Описание прибора

Выполнение лабораторной работы будет производиться с помощью центрифуги лабораторной медицинской типа РС-6, которая имеет следующие технические характеристики:

- максимальная частота вращения 6000 об/мин. (100 с^{-1}).
- диапазон регулирования частоты вращения 500-6000 об/мин. ($83\text{-}100 \text{ с}^{-1}$).
- пределы регулирования температуры в рабочей камере от -5° до $+20^{\circ}\text{C}$ ($268\text{-}293 \text{ K}$).
- диапазон регулирования времени работы в режиме автоматического отключения привода 0-60 мин.
- время динамического торможения не более 8 мин.
- фактор разделения 7200.

Все составные части центрифуги смонтированы на каркасе, который закрыт со всех сторон навесными панелями. Системы управления и контроль работы центрифуги выведены на специальный пульт управления.

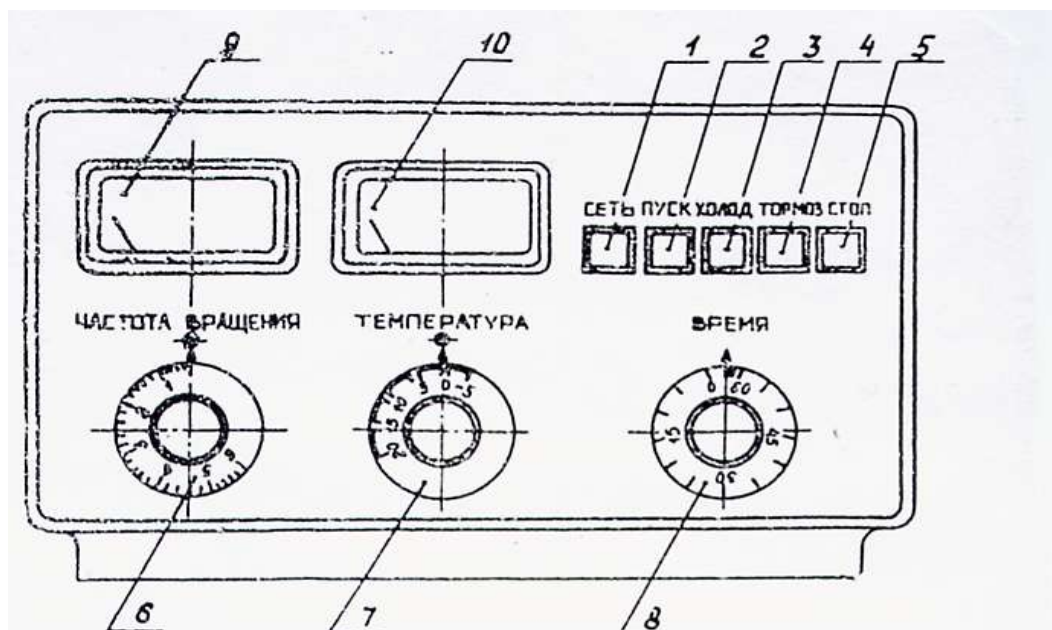


Рис.5. Пульт управления: 1- кнопка включения (отключения) сети питания; 2- кнопка пуска привода, приводящего в движение ротор; 3- кнопка включения (отключения) холодильной системы; 4- кнопка включения (отключения) динамического торможения привода; 5- кнопка остановки привода; 6- ручка задатчика частоты вращения привода; 7- ручка задатчика температуры; 8-ручка механизма отсчета времени; 9- индикатор частоты вращения; 10- индикатор температуры.

Пульт управления (рис. 5) представляет собой стойку, расположенную на центрифуге. На пульте управления расположены основные органы управления и контроля работы центрифуги:

а) Кнопка СЕТЬ (поз.1) предназначена для включения (отключения) питания, подаваемого на центрифугу;

б) кнопка ПУСК (поз.2) предназначена для включения привода центрифуги;

в) кнопка ХОЛОД (поз.3) предназначена для включения (выключения) холодильной системы центрифуги;

г) кнопка ТОРМОЗ (поз.4) предназначена для включения (отключения) динамического торможения центрифуги;

д) кнопка СТОП (поз.5) предназначена для отключения привода центрифуги в режиме ручного отключения привода при аварийной ситуации;

е) ручка задатчика частоты вращения ЧАСТОТА ВРАЩЕНИЯ (поз.6) предназначена для установки необходимой частоты вращения вала привода центрифуги;

ж) ручка задатчика температуры ТЕМПЕРАТУРА (поз.7) предназначена для задания температуры в рабочей камере центрифуги;

з) ручка механизма отсчета времени ВРЕМЯ (поз.8) предназначена для

задания необходимого режима отключения привода центрифуги и установления времени работы центрифуги в режиме автоматического отключения привода;

и) стрелочный индикатор (поз.9) предназначен для визуального контроля за величиной частоты вращения вала привода;

к) стрелочный индикатор температуры (поз.10) предназначен для визуального контроля температуры в рабочей камере центрифуги.

Все кнопки на пульте управления представляют собой световые табло, что позволяет вести визуальный контроль за состоянием центрифуги в процессе управления ею и в процессе ее работы.

Правила техники безопасности

Работы, связанные с эксплуатацией центрифуг, относятся к работам с повышенной опасностью. Работающий на центрифуге должен придерживаться последовательности операций при работе на оборудовании согласно инструкции используемого оборудования.

При работе с центрифугой запрещается:

1. Работать без заземления.
2. Работать с открытой крышкой ротора и центрифуги.
3. Работать со стеклянными пробирками при частоте вращения свыше 4000 об/мин.
4. При неполной загрузке ротора необходимо размещать только предварительно уравновешенные на центрифужных весах пробирки в гнездах согласно приведенной ниже схеме.

Порядок работы:

Приготовление гомогената:

1. Приготовить 150 мл среды выделения следующего состава:
0,25 М сахарозы
10 мМ трис(HCl)
0,2 мМ ЭДТА
2. Отмытую и охлажденную на сахарозном льду навеску (~ 10 - 15 г) печени порезав на кусочки поместить в металлический стакан гомогенизатора.
3. Залить содержимое стакана 80 г среды выделения.
4. Закрепить металлический стакан на гомогенизаторе (на стакане имеется резьба).
5. Включить гомогенизатор в сеть и гомогенизировать 2 мин.
6. Перелить гомогенат в химический стакан, отфильтровав жидкость через несколько слоев марли.

Осаждение ядер:

1. Подготовленный для центрифугирования раствор разлить в специальные

пластиковые пробирки (по 25 мл), уравновесить попарно на центрифужных весах и расставить в роторе. При неполной загрузке ротора размещать пробирки в гнездах согласно приведенной ниже схеме.

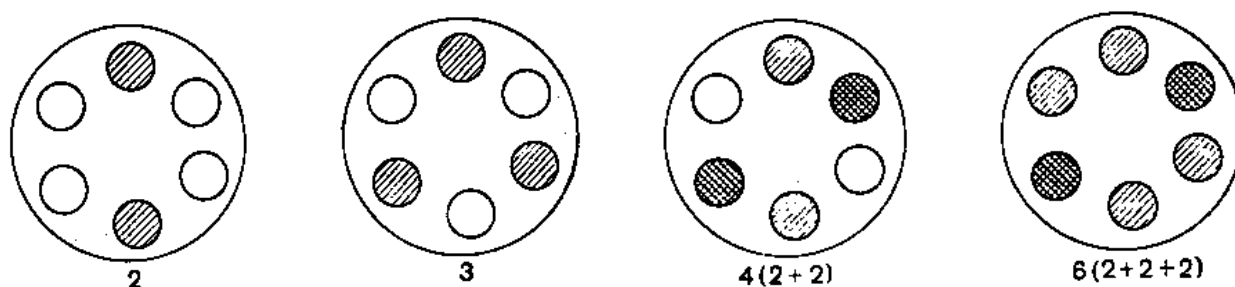


Рис.6. Расположение 2,3 ,4 и 6 пробирок в шестигнездовом роторе центрифуги.

2. Закрыть ротор крышкой.
3. Закрыть крышку рабочей камеры на защелку (фиксатор на торце крышки).
4. Установить ручку задатчика частоты вращения в положение 2000 об/мин.
5. Установить ручку механизма отсчета времени в положение «15 мин».
6. Ручку «задатчик температуры» установить на требуемый диапазон температур (5°C) и, включив холодильную систему нажатием кнопки ХОЛОД, дождаться установления заданной температуры.
7. Включить привод центрифуги нажатием кнопки ПУСК. Через некоторое время, зависящее от типа ротора и задаваемой частоты вращения, привод центрифуги автоматически выведет ротор на заранее заданную частоту вращения (контроль осуществляется по индикаторам частоты вращения).
8. По прошествии времени центрифугирования отключить центрифугу нажатием кнопки СТОП.
9. После полной остановки ротора открыть крышку рабочей камеры, снять крышку ротора и извлечь пробирки.
10. Слить надосадочную жидкость, а осадок залить средой суспендирования и аккуратно перемешать (в осадке будут ядра и некоторое количество крупных фрагментов клеток).
11. После окончания работы отключить подаваемое на центрифугу напряжение нажатием на кнопку СЕТЬ.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Фактор разделения, дайте определение. С какой целью вводят данную величину?

2. Определить по номограмме величину g для заданных характеристик центрифуги.
3. Как зависит время оседания частиц от их параметров (радиус, удельный вес)?
4. Проанализируйте классификацию методов препаративного центрифугирования. К какому виду относится центрифугирование проведенное в работе.
5. Воспроизведите схему получения чистого препарата методом дифференциального центрифугирования на примере клеточных ядер.
6. Сравните условия дифференциального центрифугирования для ядер и микросом. Объясните различия.
7. Дайте общую характеристику разделения фракций в градиенте плотности. В чем преимущество использования данного вида центрифугирования?

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Сивухин Д.В. Общий курс физики. - М: Физматлит: 1980.- Т.1-2.- 532с.

Лабораторная работа № 2

ИЗУЧЕНИЕ ЯВЛЕНИЯ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА ДРОЖЖЕВЫХ КЛЕТОК

Цель работы : Изучение электрических свойств поверхности дрожжевых клеток в среде с различным значением pH.

Необходимое оборудование, принадлежности и материалы: микроскоп, окуляр-микрометр, объект-микрометр, электрофоретическая установка, секундомер; насыщенный раствор CuSO_4 , 10% раствор KCl , раствор сахарозы, 0,1 М раствор лимонной кислоты, 0,2 М раствор Na_2HPO_4 , дрожжи.

Подготовка к работе.

Повторить следующие вопросы:

1. Электрические свойства клеточных мембран.
2. Понятие двойного электрического слоя клетки.
3. Особенности поведения биологических клеток в постоянном электрическом поле.
4. Зависимость перераспределения поверхностных зарядов клетки от значения pH среды.

Протоплазма клеток, межклеточная жидкость, кровь, лимфа представляют собой сложные коллоидные гетерогенные системы. Под влиянием электрического поля в этих системах может наблюдаться движение дисперсной фазы относительно дисперсионной среды. Это явление получило название **электрофорез**. Движение частиц в электрическом поле обусловлено наличием у них поверхностного (или объемного) заряда и подобно движению ионов.

Наличие заряда у частицы обычно вызвано двумя причинами. *Частица может содержать вещества, молекулы которых имеют диссоциирующие химические группы.* При контакте с водой происходит диссоциация, и частица приобретает заряд противоположный по знаку относительно заряда отделившейся ионной группы. Этот заряд имеет в основном белковую природу, поскольку зависит от диссоциации белковых молекул. *Во втором случае молекулы вещества, могут не содержать ионообразующих групп, но при соприкосновении с водной средой приобретают заряд вследствие неодинаковой адсорбции содержащихся в ней ионов.*

В результате этого в области границы раздела частица-жидкость образуется пространственное разделение зарядов противоположного знака, получившее название **двойного электрического слоя**. Ионы, определяющие заряд поверхности частицы называются **потенциалобразующими**, а окружающие их противоположно заряженные ионы называются **противоионами**. Образующийся вокруг частицы слой противоионов условно разделяется на два слоя: **адсорбционный** и **диффузный**. **Адсорбционный слой** представлен противоионами, которые обладают достаточно высокой энергией сцепления с поверхностью частицы, т.е. практически жестко связаны с ней. Другая часть относительно подвижных противоионов, которая участвует в диффузионном обмене с ионами среды, составляет **диффузный слой**.

Под действием внешнего электрического поля, направленного вдоль границ раздела, возникает относительное перемещение противоположно заряженных обкладок двойного электрического слоя, что и приводит к относительному движению двух фаз. Разность потенциалов в той области диффузной атмосферы, которая при тангенциальном движении жидкости перемещается относительно твердого тела, называется **электрокинетическим потенциалом** (ξ /дзета/-потенциал).

При таком подходе в определении ξ -потенциала окружающий частицу двойной электрический слой удобно представить в виде двух разноименно заряженных

цилиндров, ось которых коллинеарна вектору $\vec{E}$ (рис.1). Но поскольку толщина двойного слоя намного меньше размеров частиц, то рассмотрение можно свести к случаю плоского конденсатора, а электрокинетический потенциал считать равным потенциалу такого конденсатора:

$$\xi = \frac{d\sigma}{\epsilon_0\epsilon} \quad (1)$$

где d - толщина двойного электрического слоя, [м];

σ - поверхностная плотность заряда, [Кл/м²];

ϵ - диэлектрическая проницаемость;

ϵ_0 - электрическая постоянная, равная $8,85 \cdot 10^{-2}$ Ф/м.

Из формулы (1) видно, что для определения величины ξ -потенциала необходимо знать поверхностную плотность заряда на границе раздела среда-частица и толщину двойного электрического слоя. Поэтому непосредственное измерение ξ -потенциала не представляется возможным, и его величину определяют косвенным путем, измеряя скорость движения частиц, образующих дисперсную фазу в электрическом поле.

Рассмотрим систему сил, прикладываемых к элементу поверхности δS одной из обкладок двойного электрического слоя. Со стороны внешнего электрического поля $\vec{E}$ действует сила $\vec{f}_{эл} = \sigma \vec{E}$. Этой силе противодействует сила внутреннего трения $\vec{f}_{вн.тр.}$ - сила сопротивления перемещению соприкасающихся слоев жидкости относительно друг друга, обусловленная действием межмолекулярных сил сцепления. Величина этой силы пропорциональна градиенту скорости относительного перемещения в направлении $\vec{r}$ перпендикулярном направлению скорости $\vec{u}$ (рис.1):

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

где: η - коэффициент вязкого трения или вязкость.

В условиях равномерного движения должен соблюдаться баланс сил $\vec{f}_{эл} = -\vec{f}_{вн.тр.}$, т.е.

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

В первом приближении можно считать, что скорость течения в области двойного слоя

изменяется линейно с расстоянием и тогда $\left| \frac{\partial \vec{u}}{\partial r} \right| = \frac{u}{d}$. С учетом этого из (2) можно

выразить σ :

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

Подставив выражение (3) для σ в формулу (1) для ξ -потенциала получаем формулу Смолуховского:

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

Отношение линейной скорости u к напряженности поля E называется *электрофоретической скоростью* w , имеющей размерность $[m^2/cB]$. В качестве значений ε и η можно взять значения диэлектрической проницаемости и вязкости для воды при $20^\circ C$:

$$\varepsilon=81, \eta=10^{-3} \text{ Нс/м}^2$$

С учетом этих значений формула (4) примет вид:

$$\xi = \frac{10^{-3} \text{ Н} \cdot \text{с} / \text{м}^2}{8,85 \cdot 10^{-12} \text{ Ф} / \text{м} \cdot 81} \cdot W \approx 1,395 \cdot 10^6 \frac{\text{Н} \cdot \text{с}}{\text{Ф} \cdot \text{м}} \cdot W \quad (4a)$$

Т.о. определение ξ -потенциала сводится к определению электрофоретической скорости. Поскольку $u=s/t$, где s - путь [м], который проходит частица за время t [с], а напряженность E можно определить как градиент потенциала электрического поля т.е.

падение напряжения на единице длины проводника $E = \frac{V}{l}$, где V - падение напряжения [В] между электродами в электрофоретической камере, l - расстояние [м] между концами электродов, то в практических целях удобно пользоваться формулой:

$$\xi = 1,395 \cdot 10^6 \frac{\text{сВ}}{\text{тВ}} \quad (4б)$$

Т.к. $1\text{Ф} = \frac{1\text{Кл}}{1\text{В}}$, а $1\text{Н} = \frac{1\text{В} \cdot \text{Кл}}{\text{м}}$ то размерность коэффициента выражается как $\left[\frac{\text{В}^2 \cdot \text{с}}{\text{м}^2} \right]$.

При подстановке всех значений в формулу (4б) в указанных размерностях величина ξ -потенциала выражается в вольтах.

Описание установки для микроэлектрофореза.

Для определения электрофоретической скорости относительно крупных частиц, показатель преломления которых в достаточной мере отличается от показателя преломления среды, применяют микроскопический метод наблюдения электрофореза. Микроэлектрофоретическая камера представляет собой предметное стекло, на которое наклеены покровные стекла, как показано на рис.2. На два других предметных стекла приклеивают по два стаканчика для растворов CuSO_4 и KCl . Стаканчики 4 и 5 соединены между собой при помощи V-образных трубок. Стаканчики 4 соединены с микрокамерой сифончиками 2. Сифончики и V-образные трубки заполнены 3% раствором агар-агара, приготовленного на насыщенном растворе KCl .

Рис.2. Электрофоретическая ячейка: 1- камера с крышкой; 2- агаровые сифоны; 3- соединительные трубки; 4- стаканчики с раствором KCl; 5- стаканчики с раствором CuSO₄; 6- металлические электроды.

Электрическая схема установки для исследования электрофореза показана на рис.3. Источник постоянного тока 1 имеет плавную регулировку, которая осуществляется с помощью потенциометра 3, а изменение направления тока осуществляется переключением коммутатора 7. Для контроля тока в цепи используется миллиамперметр 6. Измерение снимаемого напряжения производится по вольтметру 4. В установке применяются неполяризующиеся электроды 9, электролитически соединенные через раствор CuSO₄ с медными электродами, которые при помощи металлических проводников соединены с выходными клеммами коммутатора.

Рис.3. Схема источника постоянного тока: 1- источник постоянного тока; 2 и 5- переключатели; 3- потенциометр; 4- вольтметр; 6- миллиамперметр; 7- коммутатор; 8- камера; 9- неполяризующиеся электроды.

Х о д р а б о т ы:

З а д а н и е 1. Определение электрофоретической скорости и ζ -потенциала дрожжевых клеток.

1. Проградуировать окулярную сетку.

Для градуировки используют объект-микрометр, который представляет собой предметное стекло, на поверхность которого нанесена эталонная микрометрическая шкала с известной ценой деления. Объект-микрометр помещают на предметный столик микроскопа, затем поворачивая окуляр в тубусе микроскопа и передвигая объект-микрометр, совмещают направление штрихов сетки с направлением штрихов объект-микрометра. Совместив один из штрихов сетки с одним из штрихов шкалы объект-микрометра, определяют, сколько делений объект-микрометра перекрывается определенным числом делений сетки. Цена деления сетки x определяется по формуле:

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

где a - цена деления объект-микрометра,

n - число делений сетки,

m - число делений объект-микрометра.

2. Собрать установку, как показано на рис.2. Камера для электрофореза помещается на предметный столик микроскопа и накрывается покровным стеклом.

3. Небольшой кусочек дрожжей поместить в забуференный **8%** раствор сахарозы и тщательно размешать. Забуферивание произвести цитратным буфером, приготовленным по Мак-Ильвену. Буфер добавлять из расчета **0,5 мл** буфера на **4,5 мл** сахарозы. Каплю взвеси поместить в камеру для электрофореза, накрыть покровным стеклом. Если в поле зрения окажется очень много дрожжевых клеток, взвесь нужно разбавить **8%** раствором сахарозы.

Наблюдение электрофореза проводят на определенной глубине, равной половине высоты камеры, где взвешенные частицы относительно подвижны. Для определения глубины камеры фокусируют объектив при помощи микровинта микроскопа сначала на покровное стекло, а затем на дно камеры. Отмечают в том и другом случае положение микровинта. Затем устанавливают микровинт в среднее положение.

4. Убедиться в отсутствии направленного движения клеток при разомкнутой цепи. Замкнуть цепь и установить при помощи потенциометра силу тока, равную **2-6 мА**. Убедиться в направленном перемещении клеток и в изменении движения на обратное при перемене направления электрического тока. Измерить скорость движения дрожжевых клеток при прямом и обратном направлениях движения не менее **5 раз**. Результаты занести в таблицу и вычислить среднее по всем данным значение скорости.

5. Измерить расстояние между кончиками электродов при помощи миллиметровой бумаги.

6. Отметить силу тока I_1 и падение напряжения в цепи V_1 .

7. Закоротить электроды путем замены в камере раствора сахарозы на насыщенный раствор **KCl**. Установить при помощи потенциометра прежнюю силу тока в цепи I_1 . Записать значение падения напряжения в цепи без падения напряжения в ячейке V_2 .

8. Определить падение напряжения в ячейке V :

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

9. Вычислить электрофоретическую скорость w и по формуле (4а) определить значение ζ -потенциала дрожжевых клеток. Сделать вывод о заряде частиц. Оценить погрешность.

З а д а н и е 2. Определение изоэлектрической точки дрожжевых клеток.

Изоэлектрическая точка является также характерным показателем физико-химических свойств поверхности клетки. В зависимости от концентрации потенциалопределяющих ионов и специфически адсорбирующихся противоионов значение электрокинетического потенциала ζ может меняться от положительного до отрицательного, равняясь нулю в изоэлектрической точке. В отсутствие специфической адсорбции противоионов изоэлектрическая точка совпадает с потенциалом нулевого заряда поверхности.

Величина ζ -потенциала в норме относительно постоянна для поверхности данного вида клетки. Однако, эта величина может подвергаться изменениям при действии на клетку различных повреждающих факторов, поверхностно активных веществ, антибиотиков, и т.д. Поэтому определенные значения величин ζ -потенциала используют для оценки функционального или патологического состояния клеток или одноклеточных организмов.

Путем определения электрофоретической скорости в широком диапазоне значений **pH** можно получить *ионный спектр* частиц, который позволяет судить о том, чем обусловлен заряд клеточной поверхности - ионизацией диссоциирующих групп или адсорбцией каких-либо ионов. Исходя же из этих данных, можно сделать вывод о состоянии поверхности частицы.

Поскольку **изоэлектрическая точка** - это то значение **pH**, при котором клетки имеют наименьший заряд, смысл работы сводится к *определению значения pH, при котором частицы будут двигаться в электрическом поле с минимальной скоростью*.

1. Приготовить 5 растворов, каждый из которых содержит **9** объемов (**4,5 мл**) **8%** раствора сахарозы и **1** (**0,5 мл**) объем буферного раствора по Мак-Ильвену (см. табл.) со значениями **pH: 2,6; 3,5; 4,6; 5,8; 8,0**.

2. В приготовленные растворы поместить дрожжевые клетки. Для всех пяти растворов провести измерения аналогичные тем, которые выполнялись в задании 1.

Представить результаты в виде таблицы.

Подвижность клеток необходимо определять при постоянной силе тока.

Таблица. Смесь Мак-Ильвена.

pH	Na ₂ HPO ₄ , мл	лим.к-та, мл	pH	Na ₂ HPO ₄ , мл	лим.к-та, 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

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ:

1. Чем определяется поверхностный заряд клетки?
2. Что такое ζ -потенциал?
3. Что такое изоэлектрическая точка?
4. От чего будет зависеть электрофоретическая скорость клетки?
5. Дайте сравнительную характеристику поверхностного потенциала и ζ -потенциала.
6. Какие сведения можно получить о свойствах поверхности частицы путем определения ее ζ -потенциала, электрофоретической скорости, изоэлектрической точки?
7. Решение задач.

Задача 1. С помощью электрофореза исследуют два вида карбоксигемоглобина, нормальный и патологический, из серповидных эритроцитов. За 14 часов на электрофореграмме произошло разделение этих двух белков. Патологический карбоксигемоглобин удался на 1 см от нормального при напряженности поля $5 \cdot 10^2$ В/м. Какой будет электрофоретическая подвижность патологического карбоксигемоглобина, если подвижность нормального $2,2 \cdot 10^{-9}$ м²/Вс.

Задача 2. С помощью электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия для ряда известных белков определено значение электрофоретической подвижности (u):

Миоглобин	$M_1=17200$ Да	$u_1=0,95$
Трипсин	$M_2=23300$ Да	$u_2=0,82$
Фумараза	$M_3=49000$ Да	$u_3=0,5$

Используя эти данные найти M_x неизвестного белка, если $u_x=0,6$. Построить график зависимости $u=f(\lg M)$.

Примечание: учесть, что для электрофореза белков в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия установлена взаимосвязь между электрофоретической подвижностью и молекулярной массой белка:

$$u=b-a \lg M$$

a, b – константы, которые зависят от свойств полиакриламидного геля.

Задача 3. При $pH=6,5$ электрофоретическая подвижность оксигемоглобина равна $2,23 \cdot 10^{-5}$, а подвижность оксигемоглобина из серповидных эритроцитов $2,63 \cdot 10^{-5}$ $cm^2/V \cdot s$. Рассчитать сколько понадобится времени для разделения этих двух белков на расстояние 2 см при напряженности электрического поля 7,0 В/см.

Задача 4. Относительная электрофоретическая подвижность (u) ряда белков в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия такова:

	М, г/моль	отн. подвижность
Миоглобин	17200	0,95
Трипсин	23300	0,82
Альдолаза	40000	0,59
Фумараза	49000	0,5
Карбоангидраза	29000	0,73

Построить график зависимости $u=f(\lg M)$. Найти молекулярную массу креатинкиназы, если электрофоретическая подвижность равна 0,6.

Молекулярная масса этого белка определена методом ультрацентрифугирования 80000. Сравните данные, сделайте выводы.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА:

1. Ю.А.Кригер, Ю.Б.Кудряшов. Электрокинетические явления в биологии, М., 1960.
2. Г.В.Троицкий. Электрофорез белков, Из-во Харьков.ун-та, 1962.
4. Е.В.Бурлакова. Малый практикум по биофизике, М., 1964.
5. В.П.Шмелев. Практикум по биофизике. Из-во Воронежского ун-та, 1973.

Лабораторная работа №3

НАБЛЮДЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ В ЛЮМИНЕСЦЕНТНОМ МИКРОСКОПЕ

Цель работы: освоить метод люминесцентной микроскопии и изучить вторичную люминесценцию биообъектов при действии внешних факторов..

Необходимое оборудование и принадлежности: люминесцентный микроскоп, предметные и покровные стекла, стеклянные палочки и пипетки; клеточная взвесь (дрожжи, эритроциты), раствор **KCl** (1,34 М), раствор акридинового оранжевого (1:10000), раствор уранина (1:10000).

Подготовка к работе.

Повторить следующие вопросы:

1. Схема электронных переходов при поглощении кванта света веществом.
2. Понятие люминесценции: первичная и вторичная люминесценция биообъектов.
3. Механизмы взаимодействия флуорофоров с биообъектами.

Люминесцентная микроскопия основана на способности определенного вещества сначала поглощать, а затем испускать световую энергию. *Интенсивность люминесценции пропорциональна интенсивности света, который вызывает люминесценцию, и количеству люминесцирующего вещества.*

В приложении к изучению биологических объектов люминесцентная микроскопия представляет собой удобный высокочувствительный метод количественного и качественного анализа люминесцирующих веществ. В частности, метод позволяет изучать такие процессы как денатурацию или комплексообразование белков. Следует указать важное преимущество метода люминесцентной микроскопии, состоящее в том, что измерение люминесценции не нарушает естественного хода биологических процессов. И, наконец, исследование может проводиться в сильно рассеивающих, гетерогенных средах, какими обычно являются биологические объекты.

Широкое применение в биофизике люминесцентного анализа также объясняется тем, что изучение люминесценции дает богатую информацию о природе процессов, происходящих на молекулярном уровне в белках и нуклеиновых кислотах. Этим процессы связаны с электронными переходами между различными энергетическими уровнями молекулы.

Каждая молекула характеризуется своим набором дискретных энергетических состояний (Рис.1). Самый низкий энергетический уровень S_0 , называемый **основным**, соответствует наименьшей энергии E_0 , которой может обладать отдельный атом или молекула. Уровни, соответствующие более высокой энергии, называются **возбужденными** S_1 . Поглощение

энергии электромагнитной волны атомом или молекулой приводит к переходу электрона с основного уровня на возбужденный. Поглощение энергии происходит отдельными порциями - **квантами**. Так при переходе с уровня S_0 на S_1 энергия поглощенного кванта $h\nu$ в точности равна разности энергий E_1 и E_0 соответствующих уровней:

$$h\nu = E_1 - E_0 \quad (1)$$

где: h – постоянная Планка;

ν – частота электромагнитной волны.

В обычных условиях молекула, как правило, находится в основном **синглетном** состоянии S_0 . Синглетное состояние характеризуется равенством нулю суммарного спина электронов. **Мультиплетность** состояния молекулы, в общем, определяется суммарным спином электронов S и равна $2S+1$. Таким образом, при $S=0$ мультиплетность равняется **1** и поэтому такое состояние называется **синглетным**. В основном состоянии для большинства молекул все электроны, находящиеся на молекулярных

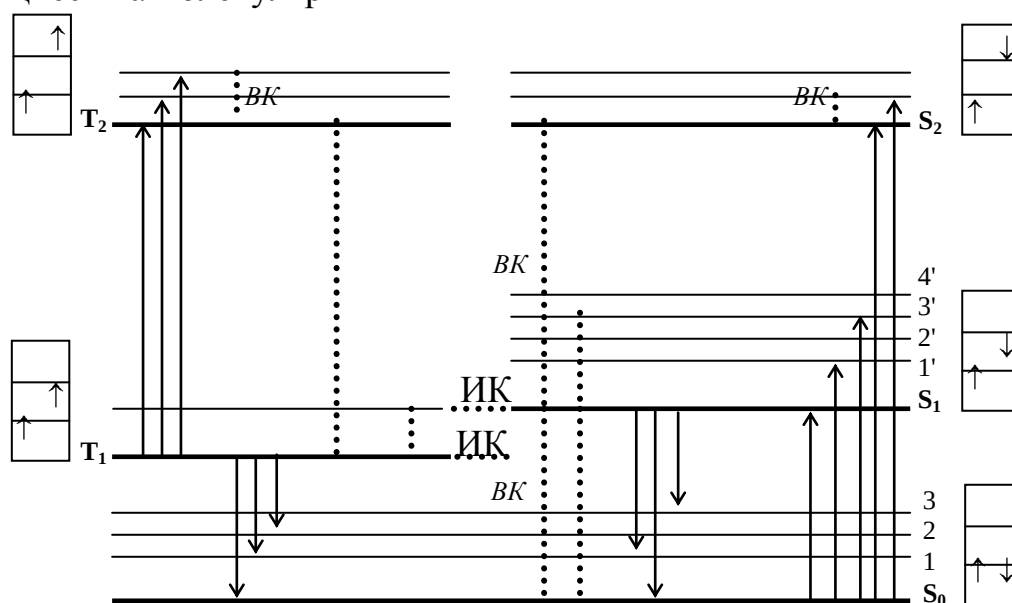


Рис. 1. Схема электронных переходов в молекулах:

S_0 – основное (невозбужденное) состояние; S_1, S_2 и T_1, T_2 – возбужденное синглетное и триплетное состояние, соответственно; возле каждого уровня показано направление возбужденного спина по отношению к спину оставшегося электрона; прямые стрелки – поглощательные и излучательные переходы, прерывистые – безызлучательные переходы; ВК – внутренняя конверсия (переходы электрона без обращения спина); ИК – интеркомбинационная конверсия (переходы электрона с обращением спина).

орбиталях, спарены. Поскольку спаренные электроны имеют **антипараллельную** ориентацию спинов, то их суммарный спин оказывается равным нулю. При поглощении кванта суммарный спин, как правило, не изменяется. Поэтому, если основное состояние синглетно, то поглощенный фотон переводит молекулу в синглетное возбужденное состояние.

Поглощение фотона происходит за время порядка 10^{-15} с, в течение следующих 10^{-12} с устанавливается тепловое равновесие возбужденной молекулы с окружающей средой. Находясь в возбужденном состоянии S_1 в течение $10^{-10} \div 10^{-8}$ с, молекула может перейти в основное синглетное состояние без излучения (происходит растрата энергии возбужденного состояния на тепловое движение окружающих молекул), либо с излучением кванта света с вероятностями q или p , соответственно. Излучательный переход $S_1 \rightarrow S_0$ называется **флуоресценцией**.

Первоначальный переход молекулы из возбужденного состояния осуществляется на колебательные подуровни основного состояния (Рис. 1), которые имеют энергию несколько больше, чем E_0 и, следовательно, энергия излучаемого кванта будет меньше, чем поглощенного. Таким образом, длина волны излучаемого света оказывается больше длины волны возбуждающего кванта. Это утверждение лежит в основе **закона Стокса**, установленного эмпирическим путем, согласно которому *длина волны люминесценции всегда больше длины волны возбуждающего света*.

Испускание квантов света всегда происходит с нижнего возбужденного уровня молекулы, независимо от того, на какой уровень был заброшен перед этим электрон в результате поглощения фотона. Это означает, что какой бы длиной волны ни была возбуждена молекула (разные вертикальные стрелки вверх на Рис. 1), излучение будет происходить из одного и того же состояния молекулы и спектр люминесценции во всех случаях будет одинаковым. Следовательно, *спектр люминесценции не зависит от длины волны возбуждающего излучения*, на этом утверждении базируется **правило Каши**.

Одним из важнейших параметров люминесценции молекулы является ее **квантовый выход k** , определяемый как отношение числа квантов люминесценции к числу поглощенных молекулой квантов возбуждающего излучения. Квантовый выход характеризует соотношение вероятностей излучательных и безызлучательных процессов. При отсутствии безызлучательных переходов в системе количество поглощенных квантов равна числу квантов люминесценции и, соответственно, величина квантового выхода будет равна единице. Но зачастую в системе происходят такие явления как передача энергии возбуждения на другие молекулы, фотохимические реакции, рассеяние энергии в виде тепла в окружающую среду. Эти процессы уменьшают вероятность излучательных переходов. При таких условиях квантовый

выход будет меньше единицы.

Ниже синглетного уровня S_1 находится уровень энергии, соответствующий триплетному состоянию T_1 . Уровень T_1 является **метастабильным**, поскольку время жизни триплетного состояния весьма велико $\sim 10^{-3} \div 10$ с. Из состояния T_1 молекула может перейти в основное состояние S_0 как излучательным, так и безызлучательным путем с вероятностями π и q_2 , соответственно. Переход $T_1 \rightarrow S_0$ сопровождается изменением ориентации спина, т.е. является запрещенным, и имеет очень малую вероятность. Поскольку вероятность перехода обратно пропорциональна времени жизни, то малая вероятность перехода $T_1 \rightarrow S_0$ обуславливает достаточно большое время жизни возбужденного состояния T_1 . Такой излучательный переход $T_1 \rightarrow S_0$ называется **фосфоресценцией**.

Оба процесса, как флуоресценция, так и фосфоресценция объединяются общим названием - **люминесценция**.

В люминесцентной микроскопии различают **первичную** и **вторичную** люминесценцию. **Первичная**, или **естественная**, люминесценция свойственна небольшой группе, веществ. Первичная люминесценция биологических объектов обусловлена присутствием в белковых молекулах остатков триптофана, которые обладают способностью поглощать на длине волны 280 нм и излучают в диапазоне 320-340 нм. Для других биомолекул характерна следующая люминесценция: для хлорофилла – ярко-красная, для витамина А – зеленая или желтая флуоресценция; липофусцин в гепатоцитах люминесцирует коричневым, а в клетках надпочечника – коричнево-красным цветом; пеницилин обладает зеленой люминесценцией.

Большинство веществ, которые содержатся в тканях и клетках, не обладают способностью флуоресцировать. Специфическое свечение таких объектов в люминесцентном микроскопе появляется после добавления специальных красителей – **флуорофоров**. В качестве флуорофоров выступают обладающие флуоресценцией ароматические органические соединения (например, фенолы, амины). Флуорофоры соединяются с изучаемыми веществами различными способами: электроадсорбцией, образуют соединения типа солей или просто растворяются в них, т.о. вызывая свечение объектов под ультрафиолетовым светом - **вторичную люминесценцию**.

Молекула люминесцирующего вещества, взаимодействуя со специфически организованными биологическими макромолекулами и их комплексами, резко увеличивает свой квантовый выход. Например, краситель аурамина, практически не люминесцирующий в водном растворе за счет большой собственной подвижности и безызлучательного рассеяния энергии, после взаимодействия с белком молекулярная структура красителя приобретает жесткость и как следствие – высокий квантовый выход.

Среди флуорофоров широко применяются **катионные** флуорофоры

(акридиновый оранжевый, аурамин), молекулы которых имеют положительно заряженную группу и **анионные** (урамин, АНС), несущие на себе отрицательный заряд.

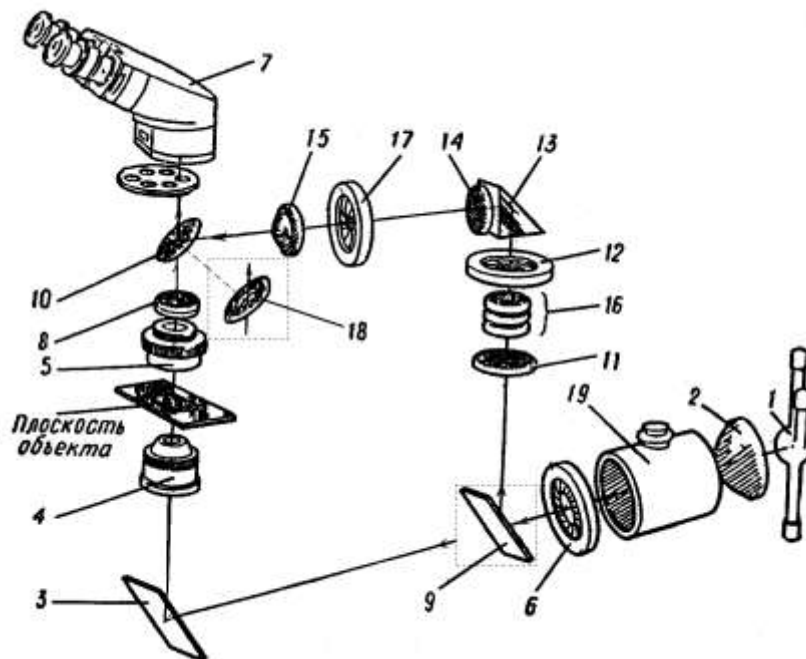


Рис.2. Оптическая схема микроскопа МЛ-2.

Описание оптической системы люминесцентного микроскопа.

Оптическая система люминесцентного микроскопа **МЛ-2** предусматривает возможность наблюдения объектов как *в проходящем свете*, т.е. при освещении объектов снизу через конденсор, так и *в свете люминесценции* при освещении объектов сверху через объектив. Возможность освещения объектов сверху имеет преимущество по сравнению с освещением снизу, через конденсор, поскольку при этом значительно повышается яркость и контрастность изображения для мутных и толстых прозрачных объектов.

Схема оптической системы микроскопа изображена на Рис. 2. Люминесцентный микроскоп состоит из тех же основных элементов, что и обыкновенный световой микроскоп, но имеет более мощный источник ультрафиолетового света и специальные светофильтры. В качестве источника света 1 применяется ртутная лампа, дающая интенсивное излучение в сине-фиолетовой области спектра и в ближней ультрафиолетовой части спектра до длины волны **340 нм**.

При освещении объектов снизу изображение источника света 1 проецируется при помощи коллекторной линзы 2 и зеркала 3 в плоскость ирисовой апертурной диафрагмы конденсора 4 и далее линзами конденсора и объектива 5 – в выходной зрачок объектива. Полевая диафрагма 6 зеркалом 3 и конденсором 4 проецируется на плоскость исследуемого объекта, изображение которого при помощи объектива 5 и

кольцевого зеркала 18 проецируется на предметную плоскость бинокулярной насадки 7. Дополнительно в ход лучей вводится корректирующая ахроматическая линза 8, которая дает увеличение системы в **1,2 раза**.

При освещении объектов сверху в ход лучей включается зеркало 9 и светоделительная пластинка 10. В этом случае изображение источника света 1 при помощи коллекторной линзы 2, зеркала 9 и линзы 11 проецируется в плоскость апертурной диафрагмы 12. Изображение апертурной диафрагмы 12 при помощи призмы 13, линз 14, 15 и светоделительной пластинки 10 проецируется в выходной зрачок объектива. В свою очередь изображение полевой диафрагмы 17 проецируется линзами 15, светоделительной пластинкой 10 и объективом 5 на плоскость исследуемого объекта. Светоделительная пластинка 10, имеющая специальное интерференционное покрытие, преимущественно отражает лучи с длиной волны **360÷440 нм** и пропускает лучи с длиной волны **440÷700 нм**, в результате чего свет флюоресценции объекта, проходя через объектив 5, будет попадать в бинокулярную насадку 7.

Для выделения из общего излучения определенных участков спектра используются светофильтры 16. Для возбуждения люминесценции УФ лучами применяют фильтры из стекла **УФС6** (максимум пропускания $\lambda=365$ нм). Светофильтры из стекла **УФС6** рекомендуется применять в основном при изучении первичной люминесценции, а также в том случае, когда важно получить в изображении большее разнообразие цветов. Для большинства исследований при изучении вторичной люминесценции флуорохромированных препаратов достаточно использовать для возбуждения светофильтры, пропускающие сине-фиолетовую область спектра, например, светофильтры из стекла **ФС1** или **СС15** (максимум пропускания **400 нм**).

Чтобы предохранить светофильтры 16 от нагрева ртутной лампой после коллекторной линзы устанавливается кювета 19, заполненная дистиллированной водой или слабым раствором медного купороса.

Х о д р а б о т ы.

З а д а н и е 1. Наблюдение вторичной люминесценции клеток, окрашенных катионным и анионным флуорохромами.

1. Внимательно изучить конструкцию, назначение и расположение органов регулировки микроскопа МЛ-2 (см. Приложение 4).

2. Подготовить микроскоп для наблюдения объектов *при освещении их сверху* (см. Приложение 4), установив необходимые светофильтры (в зависимости от изучаемых объектов и применяемых флуорохромов) и рукоятки переключения в соответствующие положение, ввести в ход лучей светоделительную пластинку, для чего рукоятку **ТП↔Л** поставить в положение **Л** ввести в ход лучей зеркало 9 (рис.2), вытянув до упора

рукоятку *ОТРАЖЕННЫЙ СВЕТ*.

3. Приступить к приготовлению препарата "раздавленная капля". Для этого каплю флуорохрома акридинового оранжевого (АО) нанести на предметное стекло. Поместить в каплю небольшое количество клеток. Каплю накрыть покровным стеклом и осторожно, но плотно придавить покровное стекло к предметному. На том же предметном стекле приготовить аналогичный препарат, но в качестве флуорохрома взять уранин (У).

4. Поместить предметное стекло с препаратами на предметный столик и, вынув светофильтр, с помощью ручек грубой и плавной настройки сфокусировать микроскоп на препарате, приготовленном с каплей АО. После фокусировки микроскопа на исследуемый объект вставить на место светофильтр, произвести, если необходимо, плавную подстройку фокусировки и отметить цвет люминесценции клеток. Перемещая столик в горизонтальном направлении, установить в поле зрения препарат с каплей уранина и произвести наблюдение. Объяснить отличия в наблюдаемой картине и сделать вывод о заряде поверхности клеток.

З а д а н и е 2. Наблюдение люминесценции клеток подвергнутых воздействию физического фактора.

1. Подвергнуть физическому воздействию исследуемые клетки.
2. Приготовить для них препараты "раздавленная капля".
3. *Произвести наблюдения люминесценции клеток и сравнить с результатами наблюдений в задании 1.*

З а д а н и е 3. Изучение влияния ионов металла на электрический заряд клеток.

Аналогично описанному выше в задании 1 методу приготовить препарат "раздавленная капля", однако, кроме красителей и клеток, в оба препарата добавить по капле раствора KCl. Провести наблюдения и отметить характер окрашивания клеток. Объяснить результаты наблюдений.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Опишите устройство люминесцентного микроскопа. Нарисуйте ход лучей в люминесцентном микроскопе.
2. Способы освещения объектов в люминесцентном микроскопе. Разделение световых потоков возбуждения и люминесценции.
3. Квантово-химическое объяснение люминесценции. Первичная и вторичная люминесценция.
4. Преимущества люминесцентной микроскопии по сравнению с другими видами микроскопии. Благодаря чему достигаются эти преимущества?

5. Собственная люминесценция биомолекул. Примеры. Использование в биофизических исследованиях.
6. Чем обусловлена люминесценция клеток животных и растений?
7. Структурные формулы красителей, использованных в лабораторной работе. Их спектры возбуждения и люминесценции.
8. На энергетической диаграмме укажите и поясните отличия между уровнями синглетного и триплетного состояний.
9. Укажите на энергетической диаграмме переходы соответствующие флуоресценции фосфоресценции.
10. Объясните правило Стокса.
11. Что называется квантовым выходом люминесценции? Перечислите факторы, оказывающие влияние на квантовый выход люминесценции.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА:

1. Михайлов И.Ф. Дьяков Н.В. Люминесцентная микроскопия. – М., Медгиз, 1961.
2. Баренблейм Г.М., Доманский А.К., Туроверов К.К. Люминесценция биополимеров и клеток. – М.-Л., Наука, 1966.
3. Ремизов А.Н. Медицинская и биологическая физика. –М., Высшая школа, 1996.
4. Антонов В.Ф., Черныш А.М. и др. Биофизика М.: Владос, 2000.- 287 с.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №4

ИССЛЕДОВАНИЕ КОНЦЕНТРАЦИОННОЙ И ТЕМПЕРАТУРНОЙ ЗАВИСИМОСТЕЙ МЕМБРАННОГО ПОТЕНЦИАЛА.

Цель работы: получение концентрационных и временных зависимостей мембранного потенциала в модельных условиях.

Необходимое оборудование и принадлежности: цифровой вольтметр, неполяризующиеся электроды (измерительный с насыщенным раствором KCl и электрод сравнения), тонкий листовой целлофан, химический стакан (100мл), химические стаканы (50мл) - 5шт., мерный цилиндр (50мл), насыщенный раствор KCl, раствор KCl неизвестной концентрации, магнитная мешалка с подогревом, термометр, штатив, фиксатор электродов, фильтровальная бумага.

Подготовка к работе.

Повторить следующие вопросы:

4. Понятие мембранного потенциала. Равновесный мембранный потенциал.
5. Механизм генерации мембранного потенциала в модельной системе и в клетке.

Мембранным потенциалом называется разность потенциалов между внутренней (цитоплазматической) и наружной поверхностями мембраны:

$$\Delta\varphi = \varphi_{\text{вн}} - \varphi_{\text{нар}} \quad (1)$$

В плазматической мембране с обеих сторон поддерживается разность потенциалов. Одной из причин установления и поддержания разности потенциалов является наличие градиентов концентраций ионов. Градиент концентраций на мембране образуется в результате различной проницаемости мембраны для тех или иных ионов.

Условием установления равновесия между двумя растворами, разделенными полупроницаемой мембраной, содержащими один тип ионов (например, K^+), которые неравномерно распределены по обе стороны мембраны, является равенство электрохимических потенциалов по одну и другую сторону мембраны:

$$RT \ln C_{\text{вн}} + zF\varphi_{\text{вн}} = RT \ln C_{\text{нар}} + zF\varphi_{\text{нар}} \quad (2)$$

где: $C_{\text{вн}}$ ($C_{\text{нар}}$) и $\varphi_{\text{вн}}$ ($\varphi_{\text{нар}}$) – соответственно концентрации ионов и электрические потенциалы с внутренней (наружной) стороны, R – универсальная газовая постоянная, T – температура, F – постоянная

Фарадея, z – заряд иона.

Учитывая уравнения (1-2) процесс генерации равновесного потенциала на мембране, которая проницаема только для одного типа ионов, можно описать с помощью **уравнения Нернста**:

$$\Delta\varphi = \varphi_{\text{вн}} - \varphi_{\text{нар}} = \frac{RT}{zF} \ln \frac{C_{\text{нар}}}{C_{\text{вн}}} \quad (3)$$

Уравнение Нернста показывает, что в условиях электрохимического равновесия разность потенциалов на мембране определяется соотношением концентраций данного иона по обе стороны мембраны.

Если мембранный потенциал обусловлен переносом ионов K^+ , при этом $[K^+]_{\text{вн}} > [K^+]_{\text{нар}}$ и $z=+1$, то равновесный мембранный потенциал будет равен

$$\Delta\varphi_{K^+} = \frac{RT}{F} \ln \frac{[K^+]_{\text{нар}}}{[K^+]_{\text{вн}}} \leq 0 \quad (4)$$

Для ионов Na^+ , при условии $[Na^+]_{\text{вн}} < [Na^+]_{\text{нар}}$ и $z=+1$ равновесный мембранный потенциал будет равен

$$\Delta\varphi_{Na^+} = \frac{RT}{F} \ln \frac{[Na^+]_{\text{нар}}}{[Na^+]_{\text{вн}}} \geq 0 \quad (5)$$

На клеточной мембране всегда существует разность потенциалов, то есть электрический потенциал внутри клетки отличается от наружного. Эта разность потенциалов называется **потенциалом покоя**. Если наружный потенциал принять равным нулю, то внутренний составит от -50 до -90 мВ, в зависимости от вида клеток. Причиной возникновения потенциала покоя является наличие градиента концентраций ионов K^+ , Na^+ , Cl^- на клеточной мембране. Если клеточная мембрана проницаема только для ионов одного вида, например, калия, тогда потенциал покоя будет определяться равновесным калиевым потенциалом и описываться **уравнением Нернста**. Но на клеточной мембране вклад в формировании потенциала покоя вносят, как правило, потоки всех ионов, коэффициент проницаемости которых отличен от нуля. В таком случае учитываются только ионы K^+ , Na^+ , Cl^- . Зависимость потенциала покоя от концентрации и коэффициента проницаемости ионов будет описываться уравнением Гольдмана-Ходжкина-Катца:

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

P_K , P_{Na} , P_{Cl} – коэффициенты мембранной проницаемости для ионов K^+ , Na^+ , Cl^- , соответственно.

В состоянии покоя мембранные проницаемости для ионов K^+ , Na^+ ,

Cl^- относятся друг к другу как $P_{\text{K}}:P_{\text{Na}}:P_{\text{Cl}}=1:0,04:0,45$. Так как в состоянии покоя проницаемость для ионов калия много больше проницаемости для других ионов, то потенциал покоя определяется преимущественно разностью концентраций ионов калия.

Поддержание разности концентраций ионов осуществляется при помощи работы ионных насосов, использующих энергию АТФ. K^+ , Na^+ -насос, кроме того способствует увеличению трансмембранного потенциала, так как выводит три иона натрия и закачивает в клетку только два иона калия, что увеличивает положительный заряд межклеточной среды, а следовательно увеличивает потенциал покоя.

Увеличение трансмембранной разности потенциалов называется гиперполяризацией, уменьшение – деполяризацией.

При воздействии на клетку какого-либо раздражителя ее трансмембранный потенциал изменяется, возникает так называемый **потенциал действия**. Причиной такого колебания потенциала покоя является изменение проницаемости мембраны для ионов натрия, что в свою очередь, вызвано открытием натриевых ионных каналов. В состоянии возбуждения коэффициенты проницаемости для ионов калия и натрия относятся как $P_{\text{K}}:P_{\text{Na}}=1:20$. В результате поток ионов натрия в клетку начинает превышать поток ионов калия из клетки. Если в состоянии покоя потенциал на мембране близок к равновесному калиевому потенциалу, то в состоянии возбуждения он стремится к равновесному натриевому потенциалу, но не достигает его, так как проводимость для ионов калия и хлора не равны нулю.

В клетке происходит деполяризация мембраны: отрицательный потенциал клетки приближается к нулю, а затем и вовсе меняется на противоположный. Такой процесс называется реверсией мембранного потенциала. Максимальное значение потенциала действия составляет обычно 30.....40мВ. Увеличение натриевой проводимости длится доли секунд. Далее она начинает снижаться, а калиевая возрастает, в результате чего в клетке восстанавливается потенциал покоя. Это процесс называется реполяризацией клеточной мембраны.

Ход работы:

Задание 1. Получение концентрационной зависимости мембранного потенциала.

1. Приготовить 5 стаканов и мерный цилиндр. Набрать 50 мл насыщенного раствора KCl в стакан №1 (раствор максимальной концентрации). В оставшихся четырех стаканах приготовить разведения первого раствора в 10, 100, 1000 и 10000 раз в количестве по ~ 50 мл каждого (такие разведения можно получить, последовательно разбавляя в 10 раз каждый предыдущий раствор, начиная с насыщенного). Таким образом, получим набор растворов убывающей концентрации.
2. Зафиксировать измерительный электрод в держателе вертикально, открытым концом вверх. С помощью шприца (5 мл) заполнить стеклянную трубку электрода насыщенным раствором KCl до половины. Кусочком целлофана накрыть открытую сторону электрода (рис. 1) и обжечь (без натяжения, стараясь не порвать пленку), после чего закрепить целлофан на трубке, туго обмотав ее ниткой виток к витку. Вынуть из фиксатора электрод и, перевернув его мембраной вниз, снова закрепить его в держателе рядом с электродом сравнения.
3. Включить вольтметр и дать ему прогреться 5 мин. Поместить электроды в стакан с наименьшей концентрацией KCl и отрегулировать электроды по высоте так, чтобы оба они были погружены в раствор (измерительный электрод должен погружаться в раствор на 3...5 мм). Измерить мембранный потенциал в милливольтх спустя 5 мин., когда показания вольтметра станут стабильными (установится равновесное значение мембранного потенциала).
4. Произвести измерения потенциалов в других стаканах, сохраняя последовательность от меньших концентраций к большим.
5. Измерить мембранный потенциал для раствора с неизвестной концентрацией KCl.

Выключить прибор. Промыть электроды дистиллированной водой и поместить их в стакан для хранения.

Результаты измерений представить в виде таблицы:

№ стакана	1	2	3	4	5
C, M					
U, мВ					

Построить график зависимости $U=f(\lg C)^*$ и, пользуясь полученным

графиком, определить концентрацию KCl в последнем растворе.

**Концентрацию исходного (насыщенного) раствора можно вычислить, зная растворимость исследуемого вещества, для KCl она составляет 255 г/л при температуре 20 °C. Концентрацию выразить в моль/л (М).*

Задание 2. Определение временной зависимости мембранного потенциала при комнатной температуре.

1. Включить рН-метр в режиме измерения напряжения и оставить для прогрева на 5...10 мин.
2. Налить в химический стакан 70 мл дистиллированной воды и погрузить в нее электроды так, чтобы мембрана измерительного электрода оказалась погруженной в воду на глубину 3...5 мм.
3. Через 5 мин. отметить показания прибора (в милливольтках) и в дальнейшем производить измерения потенциала через каждые 4 минуты в течение 30 мин.

Результаты измерений представить в виде таблицы:

Время, мин	
U, мВ	

По полученным результатам построить график.

Задание 3: Определение температурной зависимости мембранного потенциала.

1. Заменить дистиллированную воду в стакане и поместить в нее мешалку (стеклянная или пластиковая капсула с ферромагнетиком).
2. Поставить стакан на платформу магнитной мешалки. Включить магнитную мешалку, задавая минимальное число оборотов.
3. Поместить электроды и термометр в воду, отметить температуру воды и величину мембранного потенциала.
4. Включить подогрев и следить за показаниями термометра. Записывать показания вольтметра при повышении температуры на каждый 1° C, до тех пор, пока температура не достигнет 70° C.
5. Выключить подогрев, выключить мешалку, промыть электроды дистиллированной водой и промокнуть фильтровальной бумагой.
6. Результаты измерений представить в виде таблицы:

T, °C	
-------	--

U, мВ	
-------	--

По полученным результатам построить график зависимости $U=f(T)$.

Задание 4. Решить задачи.

Задача 1. Рассчитать равновесный мембранный потенциал $\Delta\phi$, создаваемый ионами калия, если внутриклеточная концентрация $c_{\text{вн}}=500\text{ммоль/л}$, внеклеточная – $c_{\text{нар}}=10\text{ммоль/л}$. Температура $T=27^\circ\text{C}$.

Задача 2. Во сколько раз внутриклеточная концентрация ионов калия должна превышать наружную, чтобы потенциал покоя составлял $\Delta\phi=91\text{мВ}$, температура $T=37^\circ\text{C}$.

Задача 3. В покое проницаемость мембраны для ионов натрия и калия относится как $P_K:P_{Na}=1:0,04$, при возбуждении $P_K:P_{Na}=1:20$. Внутриклеточная концентрация ионов калия составляет $c_{\text{вн}}=550\text{ммоль/л}$, внеклеточная – в 50 раз меньше; внутриклеточная концентрация ионов натрия $c_{\text{вн}}=50\text{ммоль/л}$, а внеклеточная – в 10 раз выше. Определить равновесный потенциал $\Delta\phi_K$ и $\Delta\phi_{Na}$ для каждого из этих ионов, величину потенциала покоя $\Delta\phi_n$ и потенциала действия $\Delta\phi_{nd}$. Температура клетки $T=27^\circ\text{C}$.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Потенциал покоя на мембране. Какие ионы поддерживают потенциал покоя на мембране?
2. Какие виды транспорта ионов через мембрану обеспечивают формирование потенциал покоя на мембране?
3. Равновесный мембранный потенциал.
4. Формирование потенциала действия на мембране. Какие ионы поддерживают потенциал действия на мембране?
5. Какие виды транспорта ионов через мембрану обеспечивают формирование потенциал действия на мембране?
6. Фермент $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$ в клеточной мембране совершил шесть циклов. Какое количество ионов натрия и калия при этом было активно транспортировано?
7. Фермент $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$ в клеточной мембране совершил шесть циклов. Какое количество энергии при этом было израсходовано, если гидролиз одного моля АТФ сопровождается освобождением 33,6 кДж?
8. Как соотносятся проницаемости биологической мембраны для различных ионов в покое?
9. Как соотносятся проницаемости биологической мембраны для различных ионов при ее возбуждении?
10. Уравнение Нернста.
11. Какова связь между проницаемостью мембраны и генерацией потенциала действия на мембране?
12. Почему равновесный потенциал ионов есть электродвижущей силой при формировании мембранных потенциалов?
13. Полупроницаемая мембрана разделяет два раствора одновалентных ионов концентрацией 50 и 500 ммоль/л. Определить разность потенциалов, которая устанавливается на мембране при температуре 37 °C.
14. Два раствора ионов лития разделены плоской билипидной мембраной. При каком соотношении концентраций ионов на мембране установится равновесная разность потенциалов $\Delta\varphi = 116$ мВ? Температура среды 20 °C.
15. Чем мембранный потенциал на полупроницаемой мембране отличается от потенциала покоя живой клетки?
16. Требуется ли энергетических затрат генерация потенциала действия?

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА.

1. Антонов В.Ф., Черныш А.М. и др. Биофизика.- М.: Владос, 2000.- 287 с.
2. Тиманюк В.А. Биофизика.- К.: Профессионал, 2004.- 704 с.

3. Ремизов А.Н. Медицинская и биологическая физика.- М.: Высшая школа, 1987.- 638 с.
4. Чанг Р., Физическая химия с приложением к биологическим системам. – М.: Мир, 1980.- 660с.

Лабораторная работа №5

ИССЛЕДОВАНИЕ СПЕКТРАЛЬНЫХ СВОЙСТВ МАКРОМОЛЕКУЛ

Цель работы: ознакомиться с теоретическими основами метода абсорбционной спектрофотометрии, исследовать образцы биополимеров методом спектрофотометрии.

Необходимые материалы и оборудование: спектрофотометр СФ-46, кварцевые кюветы, пробирки, водные растворы ароматических аминокислот, белка и ДНК, дистиллированная вода, пипетки, водяная баня, лед, фильтровальная бумага.

Подготовка к работе.

Повторить следующие вопросы:

1. Основной закон абсорбционной спектрофотометрии - закон Бугера-Ламберта-Бера.
2. Особенности химической структуры биополимеров (белки, ДНК).
3. Физико-химические свойства аминокислот и нуклеиновых оснований.
4. Особенности поглощения энергии света биомолекулами.

Свойство атомов и молекул поглощать свет с определенной длиной волны, характерной для данного вещества, используется для качественных и количественных исследований. Поглощение света связано с электронными переходами между энергетическими уровнями в молекулах, поэтому измерение спектров поглощения позволяет судить о строении молекул, химическом составе вещества и его состоянии в биологических структурах.

Поглощение кванта электромагнитной энергии атомами и молекулами осуществляется в широком диапазоне длин волн. Классификация областей электромагнитного излучения представлена в табл. 1.

Таблица 1

Классификация областей электромагнитного спектра

Область спектра	Спектральные характеристики	
	λ , нм	ν , см ⁻¹
Вакуумный ультрафиолет	10-200	$5 \cdot 10^4$ - 10^6
Ультрафиолет	200-400	$2,5 \cdot 10^4$ - $5 \cdot 10^4$
Видимая	400-750	$1,3 \cdot 10^4$ - $2,5 \cdot 10^4$
Ближняя инфракрасная	750 - $2,5 \cdot 10^4$	400 - $1,3 \cdot 10^4$
Дальняя инфракрасная	$2,5 \cdot 10^4$ - 10^6	10-400

Абсорбционная спектроскопия – раздел спектроскопии, исследующий поглощательную способность химических веществ. Абсорбционные спектры получают при пропускании электромагнитного

излучения через слой исследуемого вещества. Каждое вещество имеет свой строго индивидуальный спектр поглощения.

Принцип ультрафиолетовой спектроскопии основан на свойстве молекул вещества поглощать излучение в диапазоне длин волн 190-380 нм (УФ-диапазон). При поглощении молекулой электромагнитных колебаний осуществляется переход из невозбужденного состояния в возбужденное с более высоким уровнем энергии, так называемый, переход с одного энергетического уровня на другой. Частоты поглощаемого излучения при переходе частицы из одного состояния в другое связаны с энергиями этих состояний соотношением

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

где:

ν - частота световой волны;

E_1 – энергия основного невозбужденного состояния;

E_2 – энергия возбужденного состояния;

h – постоянная Планка ($6,626 \cdot 10^{-34}$ Дж·с).

Однозначная количественная связь между энергией поглощаемых квантов и волновыми характеристиками излучения определяется формулой Планка:

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

где:

λ - длина волны;

c – скорость света.

Если среди многочисленных состояний частицы нельзя найти пару таких состояний, чтобы разность их энергий равнялась $h\nu$ энергии падающего кванта, то излучение с частотой ν , согласно формуле (2), не должно поглощаться веществом, состоящим из этих частиц.

Поглощение молекулой электромагнитного излучения сопровождается изменением энергии электронов (электронные переходы), изменением колебания ядер атомов (колебательные переходы), а также изменением вращения диполя (вращательные переходы). Для возбуждения электронных переходов необходимо больше энергии, чем для осуществления колебательных и вращательных переходов. Поэтому поглощение в ультрафиолетовой и видимой областях спектра вызывает электронные переходы в молекуле, поглощение инфракрасного и более длинноволнового излучения – колебательные и вращательные переходы. Поглощение кванта света молекулами вещества в ближней ультрафиолетовой и видимой областях спектра возможно при наличии в их структуре сопряженных двойных связей и гетероатомов, входящих в

систему этих связей (например: атом азота в индольном кольце триптофана). Энергия верхних заполненных электронных уровней у неподеленных электронов гетероатомов (n-орбитали) значительно превышает энергию как σ -электронов, образующих одинарные связи между атомами (σ -орбитали), так и π -электронов, образующих сопряженные двойные связи (π -орбитали). Распределение энергий указанных электронных состояний с возможными энергетическими переходами, при поглощении молекулой излучения в ультрафиолетовом диапазоне, схематически представлено на Рис. 1.

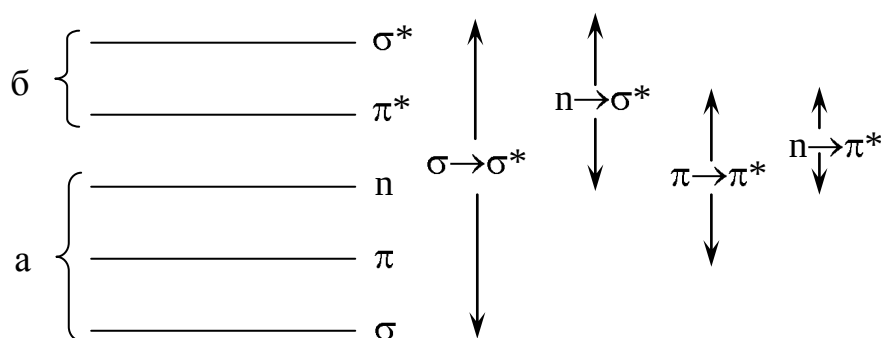


Рис. 1 Схема электронных переходов между различными типами атомных и молекулярных орбиталей: а – орбитали основного состояния; б – вакантные орбитали.

При поглощении фотонов могут происходить электронные переходы следующего вида: $\sigma \rightarrow \sigma^*$ - высокоэнергетический коротковолновый переход с максимумом поглощения 190 нм и меньше; $\pi \rightarrow \pi^*$ - для возбуждения такого перехода необходим фотон с энергией гораздо меньше, чем в первом случае, максимум поглощения 260 нм и меньше; $n \rightarrow \pi^*$ - длинноволновый переход с максимумом поглощения 340 нм и меньше.

Разность энергий между энергетическими уровнями определяет длину волны, на которой происходит поглощение излучения, вероятность перехода между этими уровнями – коэффициент поглощения вещества. Интенсивность полос поглощения определяется вероятностью перехода молекул из основного состояния в возбужденное. Зависимость вероятности поглощения излучения веществом от частоты или длины волны излучения называется **спектром поглощения**. Набор поглощаемых частот или длин волн определяется природой вещества. Спектры поглощения биополимеров представляют собой сравнительно плавные кривые с одним или несколькими максимумами, тогда как спектры поглощения атомов и простых молекул в газовой фазе имеют линейчатый вид.

Практически, измерение спектров поглощения сводится к оценке доли излучения, поглощенной в объеме определенной толщины для

разных длин волн. Рассмотрим слой толщины x , в котором в концентрации C находится вещество, поглощающее излучение. При прохождении излучения с интенсивностью потока I_0 через слой толщиной Δx интенсивность излучения уменьшится на величину ΔI . Величина ΔI зависит от интенсивности падающего излучения I_0 , толщины слоя Δx и концентрации поглощающего вещества в слое. Количество поглощающего вещества пропорционально его концентрации C и толщине слоя Δx . Если ввести коэффициент пропорциональности k , характерный для данного вещества и данной длины волны, то можно записать:

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

При условии, когда $\Delta x \rightarrow 0$ выражение (3) можно записать в дифференциальной форме:

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

Интегрируя выражение (4) в пределах от I_0 к I для dI и от 0 до x для dx получим выражение:

$$I = I_0 \exp(-kCx) \quad (5)$$

Выражение (5) есть **закон Ламберта-Бера** – основной закон абсорбционной спектрофотометрии, связывающий интенсивность I излучения, прошедшего через слой, и интенсивность I_0 излучения, падающего на него.

Если коэффициент пропорциональности $k=2,303\varepsilon$, то закон Ламберта-Бера примет вид:

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

Величина ε , характеризующая способность вещества к поглощению света определенной длины волны, называется **молярным коэффициентом экстинкции**. Если толщина слоя измеряется в **см**, а концентрация — в **моль/л**, то единицей измерения ε является **л/(моль·см)**⁻¹. Поскольку число **молей** в **литре** равно числу **ммолей** в **мл**, т. е. в **1 см³**, можно ту же единицу записать в виде **см²/ммоль**. По физическому смыслу молярный коэффициент экстинкции в этой системе единиц есть число, показывающее, на какой площади нужно разместить **1 ммоль** ($6,02 \cdot 10^{20}$ молекул) вещества, чтобы при прохождении излучения через такую поверхность интенсивность излучения упала бы в **10 раз**.

Соотношение (5) часто записывают в прологарифмированной форме, введя понятие **оптической плотности** слоя вещества, как десятичного логарифма отношения интенсивности потока падающего на вещество излучения к интенсивности потока прошедшего излучения:

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

При этом:

$$D = \varepsilon Cl$$

(8)

Как видно из формул (7) и (8), измерив отношение интенсивностей падающего и прошедшего света и зная величину ε поглощающего вещества можно определить концентрацию C вещества.

Способность биомолекул поглощать свет обусловлена присутствием в их составе хромофоров - молекулярных групп, поглощающих свет. Обычно это полярные группы или группы с ненасыщенными связями. Примеры таких групп и ориентировочные значения их $\lambda_{\text{макс}}$ приведены в табл. 2. Если два хромофора разделены достаточно длинной углеводородной цепью, их поглощение будет практически аддитивным, тогда как при близком расположении они могут через сопряжение влиять друг на друга, существенно изменяя спектр молекулы.

Таблица 2

Примеры хромофорных групп

Хромофор	$\lambda_{\text{макс}}$, нм
--C $\equiv$ C--	180
--C ₆ H ₅	270
--NO ₂	270
>C=O	280
--N=N--	370

Белки имеют три типа хромофорных групп: собственно пептидные группы, боковые группы аминокислотных остатков и простетические группы. Первые две поглощают в УФ области и не поглощают в видимой области. В ближнем ультрафиолетовом диапазоне спектра поглощением обладают только три аминокислоты: триптофан, тирозин, фенилаланин. Максимумы поглощения, специфические для каждой аминокислоты, лежат в области 260-280 нм.

Таблица 3

Спектральные свойства аминокислот при нейтральном pH

Аминокислоты	Коэффициент молярной экстинкции, моль ⁻¹ ·см ⁻¹ ·л	Максимум поглощения, нм
Триптофан	5,6·10 ³	280
Тирозин	1,38·10 ³	275
Фенилаланин	0,18·10 ³	257

При включении аминокислот в структуру белка их спектры не очень изменяются. Поэтому оптическая плотность раствора белка равняется сумме оптических плотностей триптофана, тирозина и фенилаланина.

Аминокислоты в свободном состоянии содержат свободные карбоксильные и аминогруппы, поэтому их спектры поглощения могут изменяться с изменением рН. Наибольшие изменения при изменении рН раствора претерпевает спектр поглощения тирозина. В щелочной среде тирозин переходит в ионизированную форму – тирозинат. Спектр поглощения тирозината смещается в длинноволновую область с максимумом поглощения 294 нм. Спектры поглощения триптофана изменяются при применении высоких концентраций H_2SO_4 , что приводит к ионизации NH -группы триптофана. В результате спектр поглощения триптофана изменяет форму и смещается в длинноволновую область.

Методом спектрофотометрического анализа оценивают чистоту белковых препаратов и отсутствие в них нуклеиновых кислот. С этой целью определяют значения оптической плотности на длинах волн 260 и 280 нм. Соотношение D_{280}/D_{260} является показателем чистоты белкового препарата, если $D_{280}/D_{260} > 1,6-1,7$ – это показатель высокой чистоты образца.

Нуклеиновые кислоты поглощают только в УФ области (180-220 и 240-280 нм). Их хромофорами являются, в основном, пуриновые и пиримидиновые основания. Основные полосы поглощения всех нуклеотидов, кроме цитидина, сосредоточены около 260 нм; у цитидина – при 270 нм. Коэффициенты молярной экстинкции хромофорных групп биополимеров зависят от природы растворителя, рН, длины волны. В таблице 4 приведены коэффициенты молярной экстинкции при 260 нм для четырех оснований.

Таблица 4

Коэффициенты поглощения пуриновых и пиримидиновых оснований

Основание	Коэффициент молярной экстинкции, $\text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1} \cdot \text{л}$
Аденин	$13,4 \cdot 10^3$
Гуанин	$7,2 \cdot 10^3$
Цитидин	$5,55 \cdot 10^3$
Тимин	$7,4 \cdot 10^3$

Спектр поглощения ДНК есть суммарный спектр поглощения мономерных нуклеотидов; их основная полоса поглощения расположена при 260 нм. Однако поглощение нативной ДНК заметно меньше, чем поглощение всех оснований входящих в ее состав. При переходе от нативной ДНК (полинуклеотида) к мононуклеотидам происходит прирост поглощения – *гиперхромный эффект*. Гиперхромизм проявляется уже в динуклеотидах (от 2 до 11%). Эффект возрастает с увеличением длины цепи и достигает максимального значения у олигонуклеотидов из 5-6

остатков.

Величину гиперхромного эффекта оценивают, измерив оптическую плотность при 260 нм для нативной ДНК (или полинуклеотида) – D_2 и денатурированной ДНК (или моонуклеотида) – D_1 , по формуле:

$$\Gamma/\% = \frac{D_1 - D_2}{D_2} \cdot 100 \quad (9)$$

Гиперхромизм проявляется при переходе от двухспиральных структур к односпиральным (однако в меньшей степени, чем при переходе от полинуклеотидов к моонуклеотидам). Он обусловлен тем, что в двойной спирали ДНК плоскости оснований параллельны (в виде стопок): такая конфигурация приводит к сильному взаимодействию оснований и снижению поглощения. Гиперхромный эффект широко используется как критерий денатурации ДНК.

Ход работы

Задание 1. Измерение спектра поглощения раствора ДНК.

Измерить спектр поглощения водного раствора ДНК в диапазоне длин волн 220-320 нм через каждые 5 нм (а в участке спектра 250-270 нм - через 3 нм). Определите концентрацию ДНК в растворе, используя закон Ламберта-Бера.

Задание 2. Определение гиперхромного эффекта ДНК.

Раствор ДНК, используемый в задании 3, залить в пробирку с притертой пробкой. Опустить пробирку в горячую водяную баню ($T=95^\circ\text{C}$) на 10-15 минут. Затем пробирку с раствором ДНК охладить на льду. Измерить спектр поглощения денатурированной ДНК в таком же диапазоне длин волн как и в задании 3. Проанализировать полученный спектр и оценить величину гиперхромного эффекта по формуле (7).

Задание 3. Измерение спектров поглощения ароматических аминокислот в свободном состоянии.

Подготовить к работе прибор спектрофотометр СФ-46 в соответствии с инструкцией.

Приготовить водный раствор триптофана в концентрациях 0,1 мг/мл, 0,05 мг/мл, 0,025 мг/мл, при $\text{pH}=7$. Снять спектры поглощения полученных растворов в области 210-320 нм через 5 нм. Проанализировать полученные спектры и проверить справедливость закона Ламберта-Бера.

Приготовить два раствора триптофана (0,05 мг/мл) в 5 М и 13 М серной кислоте. Измерить спектры поглощения в области 210-320 нм через 5 нм. Сравнить данные спектры со спектром раствора триптофана при $\text{pH}=7$ для концентрации 0,05 мг/мл. Объяснить наблюдаемый эффект. Рассчитать коэффициенты молярной экстинкции в максимумах для водного и кислотного растворов триптофана.

Задание 4. Измерение спектров поглощения растворов белков.

Приготовить водные растворы белков яичного альбумина и трипсина в концентрациях 0,2 мг/мл и 0,6 мг/мл, по две концентрации растворов каждого белка. Измерить спектры поглощения белков в области 210-320 нм через 5 нм. По полученным спектрам оценить степень чистоты белковых препаратов, значение коэффициентов экстинкции в максимумах для обоих образцов.

Задание 5. Решить задачи.

Задача 1. Оптическая плотность раствора, содержащего вещество с молярной массой $M=423$ в концентрации $C=23$ мкг/мл, составляет 0,27 при длине волны $\lambda=540$ нм в односантиметровой кювете. Найти молярную концентрацию и коэффициент молярного поглощения для данного вещества.

Задача 2. Имеется раствор аденина, оптическая плотность которого при $\lambda=260$ нм составляет 0,5, и раствор гуанина, оптическая плотность которого для той же длины волны – 0,36. Какова оптическая плотность раствора той же толщины, если смешали по 1 мл каждого раствора. Считать, что молекулы не взаимодействуют между собой.

Задача 3. Определить концентрацию C вещества, если при данной длине волны его слой толщиной $l=1$ см уменьшает интенсивность падающего потока света в 8 раз. Молярный коэффициент экстинкции вещества $\epsilon=10,75 \text{ л} \cdot (\text{моль} \cdot \text{см})^{-1}$.

Задача 4. Водный раствор аденазина (0,1 мл) разбавили до объема 25 мл. После разбавления оптическая плотность раствора составила 0,77 при $\lambda=260$ нм в кювете толщиной 1 см. Каково пропускание разбавленного раствора и чему равна концентрация аденазина до разбавления, если $\epsilon=1,54 \cdot 10^4 \text{ л} \cdot (\text{моль} \cdot \text{см})^{-1}$.

Задача 5. Раствор ДНК с $M=500\,000$ Да и концентрацией 50 мг/мл имеет оптическую плотность $D=0,66$, толщина кюветы 1 см; а) определите коэффициент молярного поглощения для данной ДНК; б) поясните, почему полученный коэффициент молярного поглощения для нативной ДНК меньше, чем для азотистых оснований.

Задача 6. В кювете толщиной 1 см исследовали поглощение раствора вещества с концентрацией 64 мкг/мл. Определить оптическую плотность и пропускание раствора при $\lambda=546$ нм, если $\epsilon=3 \cdot 10^5 \text{ л} \cdot (\text{моль} \cdot \text{см})^{-1}$, $M=320$ кДа.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Определение спектра поглощения электромагнитных волн веществом.

2. Чем объясняется наличие полос поглощения электромагнитных волн макромолекулами в УФ-области спектра?
3. Какие физико-химические особенности биополимеров определяют положение максимумов их спектров поглощения (длинноволновая и коротковолновая область)?
4. Почему атомы и простые молекулы в газовой фазе имеют линейчатые спектры поглощения, а для растворов биомолекул характерны широкие (размытые) спектры?
5. Переходы между электронными состояниями молекул проявляются в ультрафиолетовой и видимой областях спектра примерно от 100 до 1000 нм. Какова энергия этих переходов?
6. Закон Ламберта-Бера, его физический смысл.
7. Определение коэффициента молярной экстинкции.
8. Основные свойства хромофоров белковых молекул.
9. Основные свойства хромофоров нуклеиновых кислот.
10. Понятие гиперхромного эффекта. Почему при переходе ДНК от полинуклеотида к мононуклеотидам наблюдается прирост поглощения?

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Владимиров Ю.А., Потапенко А.Я. Физико-химические основы фотобиологических процессов. - М.: Высшая школа, 1989.- 190с.
2. Чанг Р., Физическая химия с приложением к биологическим системам. – М.: Мир, 1980.- 660с.

Лабораторная работа №6

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ И РАЗМЕРОВ КЛЕТОК МЕТОДОМ СВЕТЛОПОЛЬНОЙ МИКРОСКОПИИ

Цель работы: определение размеров дрожжевых клеток и их концентрации с помощью микроскопа.

Необходимое оборудование, принадлежности и материалы: световой микроскоп “биолам-70”, камера Горяева, объект – микрометр, химические стаканы, стеклянные палочки, мерная посуда, покровные стекла, физ. раствор, донорская кровь, фильтровальная бумага.

Подготовка к работе.

Повторить следующие вопросы:

1. Принцип работы микроскопа. Ход лучей в микроскопе.
2. Особенности строения камеры Горяева. Принцип подсчета объектов в камере Горяева.

С помощью микроскопа изучают морфологию и строение клеток микроорганизмов, их рост и развитие. Микроскопы позволяют получить увеличение в сотни раз (световые микроскопы) и десятки-сотен тысяч раз (электронные микроскопы) изображение исследуемых образцов.

Устройство микроскопа. Микроскоп состоит из двух частей: механической (подсобной) и оптической (главной).

Механическая часть. К ней относится штатив, предметный столик и тубус (труба). К штативу примыкает коробка механизмов, система зубчатых колес для регуляции положения тубуса. Система приводится в движение вращением макрометрического и микрометрического винтов.

Макрометрический винт служит для предварительной ориентировочной установки изображения рассматриваемого объекта на фокус.

Микрометрический винт используют для последующей, более четкой установки на фокус. При полном повороте микрометрического винта тубус передвигается на 0,1 мм (100 мкм). При вращении винтов по часовой стрелке он опускается по направлению к препарату, при вращении против — от препарата.

На предметный столик помещают препарат с объектом исследования. Предметный столик вращается и перемещается во взаимно перпендикулярных плоскостях с помощью винтов. В центре него находится отверстие для освещения препарата снизу лучами света, направляемыми зеркалом микроскопа. На столике вмонтированы два зажима (клеммы) — пружинящие металлические пластинки, предназначенные для закрепления препарата.

Тубус — оправа, в которую заключены элементы оптической системы микроскопа. К нижней его части прикрепляют револьвер (объективодержатель) с гнездами для объективов. Современные модели микроскопов имеют наклонный тубус с дугообразным тубусодержателем, что обеспечивает горизонтальное положение предметного столика.

Оптическая часть микроскопа. Она состоит из основного оптического узла (объектив и окуляр) и вспомогательной осветительной системы (зеркало и конденсор). Все части оптической системы строго центрированы в отношении друг друга. Во многих современных микроскопах зеркало и конденсор заменены вмонтированным в прибор регулируемым источником света.

Осветительная система находится под предметным столиком. Зеркало отражает падающий на него свет в конденсор. Конденсор (лат. *Condensio* — уплотняю,

сгущаю), состоящий из 2—3 короткофокусных линз, собирает лучи, идущие от зеркала, и направляет их на объект. Линзы конденсора вмонтированы в металлическую оправу, соединенную с зубчатым механизмом, позволяющим перемещать конденсор вверх и вниз специальным винтом. Для регулировки интенсивности освещения в конденсоре есть ирисовая (лепестковая) диафрагма, состоящая из стальных серповидных пластинок. Для получения более четкого изображения исследуемого объекта важно отрегулировать степень раскрытия диафрагмы. Окрашенные препараты лучше рассматривать при почти полностью открытой диафрагме, неокрашенные — при уменьшенном отверстии диафрагмы.

Объектив — наиболее важная часть микроскопа. Это многолинзовая короткофокусная система, от качества которой зависит в основном изображение объекта. Наружная линза, обращенная плоской стороной к препарату, называется фронтальной, она обеспечивает увеличение. Остальные линзы в системе объектива выполняют преимущественно функции коррекции оптических недостатков, возникающих при исследовании объектов.

Объективы бывают сухие и погружные (иммерсионные). При работе с *сухими объективами* между фронтальной линзой объектива и объектом исследования находится воздух. Оптический расчет *иммерсионных объективов* предусматривает их работу при погружении фронтальной линзы объектива в жидкую однородную среду. При работе с сухим объективом вследствие разницы показателя преломления стекла (1,52) и воздуха (1,0) часть световых лучей отклоняется и не попадает в глаз наблюдателя. При работе с иммерсионным объективом необходимо между покровным стеклом и линзами объектива поместить кедровое масло, показатель преломления которого близок к показателю преломления стекла.

Объективы различают по их увеличению. Собственное увеличение (V) объективов определяют по формуле

$$V = \frac{l}{t}$$

где l — оптическая длина тубуса или расстояние между фокальной плоскостью объектива и плоскостью изображения, для разных объективов оно колеблется в диапазоне 128 - 180 мм; f — фокусное расстояние объектива. Чем больше фокусное расстояние, тем меньше увеличение объектива.

У объективов с малым увеличением расстояние от фронтальной линзы объектива до препарата больше, чем у объективов с большим увеличением. В зависимости от этого необходимо строго следить, каким винтом (макрометрическим или микрометрическим) следует пользоваться при фокусировке объектива. Так, объективы с увеличением 8х, 40х и 90х имеют соответственно рабочие расстояния 13,8, 0,6 и 0,12 мм. Иммерсионный объектив имеет рабочее расстояние до объектива 0,12 мм. У объективов малых увеличений не только большие рабочие расстояния, но и большие поля зрения. В связи с этим рекомендуется исследование препарата начинать с небольшого увеличения.

Разрешающая способность — одна из важных характеристик объектива, определяющая в конечном итоге разрешающую способность микроскопа в целом. Она определяет наименьшее расстояние между двумя точками на препарате, которые будут видны раздельно. Разрешающая способность объектива зависит от его числовой апертуры и длины волны света, при которой идет наблюдение объекта. Математически такая зависимость выражается формулой

$$d = \frac{\lambda}{A}$$

где λ — длина волны света, воспринимаемая человеческим глазом (0,4 — 0,7 мкм. Отсюда средняя длина волны 0,55 мкм); A — числовая (нумерическая) апертура объектива.

Предел разрешающей способности объектива или наименьшую величину d можно представить следующим образом.

Пусть значение λ — наименьшее (для более коротких, чем видимые, ультрафиолетовых лучей оно равно 350 нм), а значение A — максимальное (в наиболее совершенных иммерсионных системах 1,4—1,6). В этом случае разрешающая способность объектива будет наибольшей по физическому смыслу и наименьшей по абсолютной величине.

Для условий работы наших микроскопов величина λ постоянна, так как объекты исследуются при обычном свете ($\lambda=0,55$ мкм). Следовательно, предел разрешающей способности зависит исключительно от возможности повышения числовой апертуры A .

Числовая апертура объектива характеризует его светособирательную способность и определяется по формуле

$$A = n \cdot \sin \frac{\alpha}{2}$$

где n — показатель преломления светового луча, проходящего через предметное стекло в среду, находящуюся между фронтальной линзой объектива и предметным стеклом; α — угол, одна сторона которого совпадает с оптической осью, другая образована линией, соединяющей точку выхода эффективных лучей из объектива с границей действующего отверстия объектива; $\frac{\alpha}{2}$ — угол входного отверстия объектива.

Важно, чтобы величина n была максимальной. Повысить ее можно введением в промежуток между фронтальной линзой объектива и предметным стеклом среды с n , близким к n стекла. На практике это достигается использованием иммерсионных объективов с введением кедрового масла ($n=1$). Дальнейшего повышения n можно достичь введением среды с n более высоким, чем у стекла.

Окуляр является как бы непосредственным продолжением линз человеческого глаза. Окуляр состоит из двух линз — глазной (верхней) и полевой, или собирающей (нижней), заключенных в металлическую оправу. Назначение полевой линзы — собирать лучи, идущие от объектива, таким образом, чтобы они проходили через маленькое отверстие глазной линзы.

Назначение окуляра — в прямом мнимом увеличении действительного обратного и увеличенного изображения, которое дает объектив.

При длительной работе с микроскопом следует пользоваться двойными окулярами — бинокулярной насадкой. Работа с бинокулярной насадкой улучшает видимость объекта, снижает яркость изображения и тем самым сохраняет зрение.

Увеличительная способность микроскопа: коэффициент увеличения микроскопа определяется произведением увеличения окуляра (K) и увеличения объектива (V) и выражается формулой: $D=K \cdot V$

Теоретически микроскоп может дать увеличение 2000х и более раз. Однако следует различать полезное и бесполезное увеличение микроскопа.

Увеличение, которое дает возможность рассматривать объект под предельным углом зрения, и есть *полезное увеличение*. Оно обычно превышает числовую апертуру объектива в 500 — 1000 раз. Например, для объектива с увеличением 40х, имеющего числовую апертуру 0,65, полезное увеличение составляет $\times 325$ — 650. С помощью

этого увеличения можно различить все структуры, разрешаемые данным объективом. Поэтому для объектива 40х следует брать окуляр 15х, чтобы получить общее увеличение в пределах полезного. Какие бы более сильные окуляры ни применялись, более тонких деталей структур выявить не удастся. Более того, применение окуляра с большим увеличением приведет к уменьшению количества света, попадающего в глаз наблюдателя, и возрастанию искажений, вызываемых дефектами зрения.

Разрешающая способность микроскопа. Эта характеристика особенно важна при исследовании микрообъектов и их структур.

Если увеличительная способность микроскопа зависит от объектива и окуляра, то разрешающая способность определяется главным образом объективом и конденсором. Максимальная разрешающая способность светового микроскопа 0,2 мкм.

Разрешающая способность микроскопа тем лучше, чем меньше абсолютная величина d .

Принцип работы со счетной камерой Горяева

В некоторых случаях бывает необходимость узнать концентрацию клеток в суспензии или других малых объектов приблизительно одинаковых размеров, для чего нужно знать количество клеток в единице объема суспензии. Подсчет числа объектов в суспензии (например, эритроцитов или дрожжевых клеток) можно легко произвести с помощью счетной камеры. Это специальное предметное стекло, устроенное таким образом, что в него можно внести определенный объем жидкости, либо это стекло с выемкой, имеющей определенную глубину и точно разделенной по дну на квадраты, которыми обозначаются ячейки определенного объема. Для различных целей выпускаются несколько типов специальных счетных камер, в том числе для подсчета клеток крови. Последние часто называются гемоцитометрами. Большинство счетных камер производятся с хорошо полированными оптически плоскими поверхностями и применяются в сочетании со специальными толстыми покровными стеклами (толстые стекла не подвержены деформации, которая может привести к заметным ошибкам в величине объема ячейки). На предметных стеклах имеются специальные канавки вокруг счетной площади, которые принимают в себя избыток жидкости в случае переполнения камеры, что важно для получения правильного объема суспензии. При соблюдении всех этих условий объем, приходящийся на сеточку, определяется ее площадью, умноженной на глубину камеры. Когда камера заполнена жидкостью, сеточка ограничивает aliquоты определенного объема (для разных моделей счетных камер эта величина может быть различной), так что подсчитанное среднее число частиц на

объема жидкости. Ошибки в подсчетах аспределены между квадратами камеры иметь ввиду. Данную ошибку можно, точно большом числе квадратов, взятых

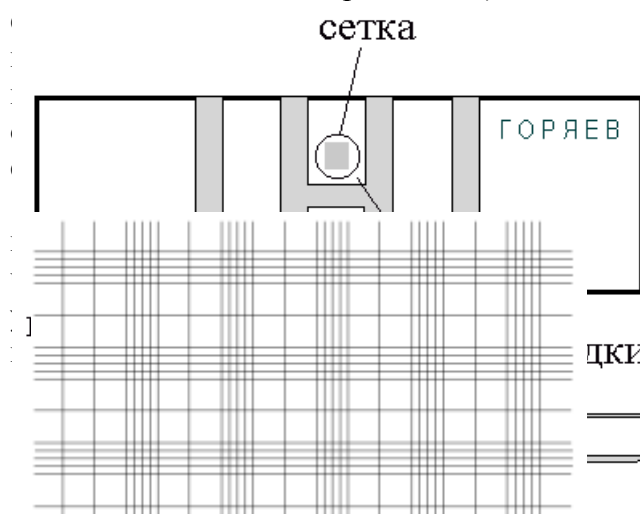


Рис. 5. Внешний вид камеры Горяева

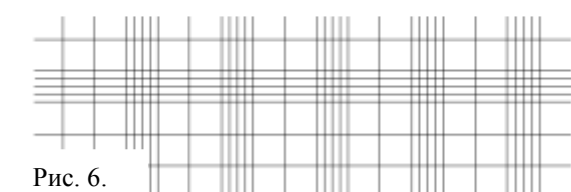
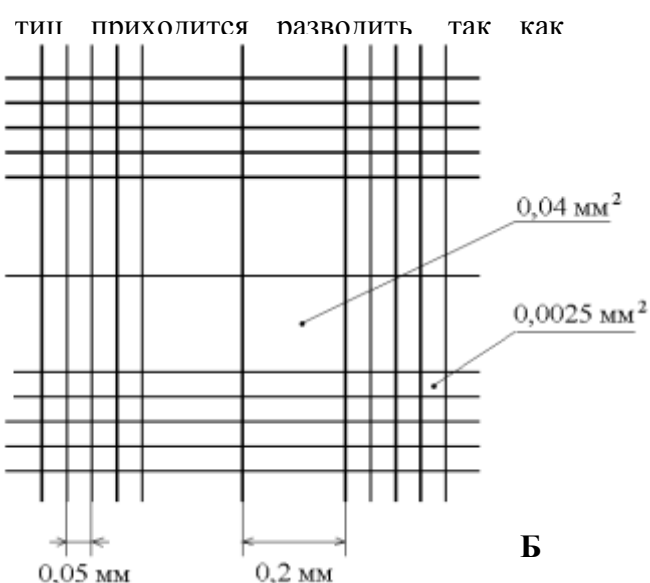


Рис. 6.



Б

квадратов и соблюдать определенные правила для подсчета частиц, попадающих на границы между квадратами. Обычно считают частицы, лежащие сверху и слева, и исключают частицы, лежащие внизу и справа.

На рис. 5 изображена счетная камера Горяева. Это толстое стеклянное предметное стекло с выемками для излишков исследуемой суспензии и двумя рабочими площадками. Уровень рабочих площадок меньше чем у других на 0,1 мм, это нужно для того, чтобы между площадкой и покровным стеклом образовался зазор. На рабочие площадки в определенном месте нанесена сетка (рис. 6-а). Сетка выполнена таким образом, что на ней имеются квадраты разного размера, в зависимости от размера подсчитываемых объектов и их количества пользуются квадратами большего или меньшего размера. Параметры сетки приведены на рис. 6-б.

Ход работы

Задание 1: Определение цены деления шкалы окуляра микроскопа при разном увеличении.

1. Выберите нужный объектив ($\times 20$) поворотом револьвера микроскопа с объективами.
2. Поместите на предметный столик микроскопа объект микрометр (стекло с нанесенными на одинаковом расстоянии друг от друга штрихами с известным интервалом в металлической оправе в форме предметного стекла). Получите четкое изображение штрихов объекта – микрометра в окуляре микроскопа путем установки оптимального освещения (поворачивая зеркало в двух плоскостях и настраивая конденсор) и настройки фокусировки изображения (грубой а затем плавной регулировкой).
3. Если шкала окуляра видна недостаточно четко, вращая лимб на окуляре, получите более четкое изображение шкалы.
4. Добейтесь того, чтобы штрихи объект – микрометра были параллельны штрихам окулярной шкалы (поворачивая окуляр в тубусе).
5. Подсчитайте количество делений окулярной шкалы (n), приходящихся на несколько штрихов объект – микрометра.
6. Зная интервал между штрихами объект – микрометра (указан на металлической оправе), определить цену деления окулярной шкалы.
7. Определить цену деления окулярной шкалы для объектива с другим увеличением ($\times 40$).

Задание 2: Определение глубины счетной камеры.

1. Поместите камеру Горяева на предметный столик и накройте ее толстым покровным стеклом, притирая его к стеклу камеры.
2. Следуя рекомендациям в первом задании, добейтесь четкого изображения сетки камеры (объектив с 20-кратным увеличением).
3. Плавной регулировкой (винт с микрометрической шкалой) сфокусируйте микроскоп на сетку (дно камеры) так, чтобы цвет линий сетки был на границе между светлым и темным. Запомните показание микрометрической шкалы на ручке плавной фокусировки.
4. Сфокусируйте микроскоп (ручкой точной фокусировки) на нижнюю поверхность покровного стекла (потолок камеры), при этом нужно отсчитывать количество делений, на которое повернулась ручка фокусировки. Зная цену

деления (2 мкм), вычислить глубину камеры, и сравнить ее с указанной.

Задание 3: Определение концентрации эритроцитов в крови.

1. Сделать 400-кратное разведение крови физиологическим раствором: 0,125 мл крови на 50 мл физ. раствора. Перемешать полученную взвесь стеклянной палочкой.
2. Медленно набрать суспензию в небольшой шприц.
3. Поместить на предметный столик камеру Горяева с притертым к ней покровным стеклом.
4. Выдавить из шприца в области рабочей площадки под покровное стекло небольшое количество суспензии (жидкость сама будет затягиваться в камеру капиллярными силами). Излишек раствора окажется в желобках.
5. Выбрать объектив с 20-кратным увеличением.
6. Сфокусировать микроскоп таким образом, чтобы были видны и эритроциты и сетка камеры (выбрать оптимальную настройку).
7. Подождать пока эритроциты осядут и приступить к подсчетам. Для того, чтобы получить наиболее точные данные, необходимо подсчитать число эритроцитов в 5 больших квадратах, расположенных в различных местах сетки. Во избежание двукратного подсчета клеток, лежащих на границе между квадратами, следует пользоваться правилами изложенными в п. "счетные камеры".
8. Найти среднее арифметическое число эритроцитов в одном квадрате.
9. Вычислить объем суспензии, приходящейся на один квадрат.
10. Вычислить концентрацию эритроцитов в 1 мм^3 крови (с учетом разведения).

Задание 4: Определение размеров эритроцитов.

1. Приготовить тоже, что и в п. 1-4 задания 3, только вместо толстого покровного стекла использовать тонкое.
2. Выбрать объектив с 40-кратным увеличением.
3. Получить четкое изображение эритроцитов.
4. Двигая предметный столик с образцом, совместить один из эритроцитов со шкалой окуляра.
5. Посчитать количество делений шкалы, приходящихся на один эритроцит.
6. Зная цену деления шкалы для выбранного объектива (из первого задания), вычислить диаметр эритроцита в мкм. Сравнить со справочными данными.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ.

1. Основные характеристики сухих и иммерсионных объективов микроскопов, в чем отличие между сухими и иммерсионными объективами.
2. От чего зависит собственное увеличение объектива? Основные отличительные характеристики объективов с малым и с большим увеличением.
3. Разрешающая способность объектива. От чего зависит величина разрешающей способности?
4. Чем определяется увеличительная способность микроскопа? Дайте определение полезного увеличения микроскопа.
5. Для каких целей и где могут быть использованы счетные камеры? Какие параметры биообъектов можно определить с помощью камеры Горяева?

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА.

2. Ремизов А.Н. Медицинская и биологическая физика.- М.: Высшая школа, 1987.- 638 с.
3. Сивухин Д.В. Общий курс физики. Оптика. - М: Физматлит: 1980.- Т.4.-532с.

Лабораторная работа №7

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОНИЦАЕМОСТИ ЭРИТРОЦИТОВ ДЛЯ ИОНОВ КАЛИЯ МЕТОДОМ ИОНОСЕЛЕКТИВНЫХ ЭЛЕКТРОДОВ

Цель работы: исследовать проницаемость мембран эритроцитов для ионов калия в модельных условиях, получить временную зависимость выхода ионов калия из эритроцитов.

Необходимое оборудование, принадлежности и материалы: цифровой вольтметр, ионоселективный (для ионов K^+) электрод, электрод сравнения, центрифуга лабораторная, центрифужные весы, центрифужные пластиковые пробирки, цельная донорская кровь, стаканы химические (50 мл) - 8 шт., раствор KCl (0,1M) приготовленный на физиологическом растворе, физ. раствор, шприц, штатив для электродов.

Подготовка к работе.

Повторить следующие вопросы:

1. Особенности строения и принцип работы ионселективного электрода.
2. Перенос ионов через плазматическую мембрану: диффузия, пассивный и активный транспорт.
3. Особенности строения плазматической мембраны эритроцита. Механизмы транспорта ионов калия через мембрану.

Определение концентрации ионов в сложных смесях, которыми являются биологические растворы, успешно осуществляется с применением ионоселективных электродов. Ионоселективный электрод – это электрод, который чувствительный по отношению к определенным ионам в среде, а его равновесный потенциал в растворе электролита, зависит от концентрации этих ионов. Наиболее характерным примером таких электродов является стеклянный электрод, потенциал которого зависит только от активности селективных ионов. Потенциометрическое определение активности того или иного иона в растворе позволяет определить его концентрацию. Специальные стеклянные ионоселективные электроды избирательны по отношению к ионам водорода, натрия, калия и серебра.

Стеклянный электрод состоит из электрода сравнения (обычно хлор-серебряный электрод), погруженный в раствор электролита (для селективных электродов по отношению к ионам водорода – это разбавленная соляная кислота, для селективных электродов по отношению к ионам калия – это насыщенный раствор KCl). Электрод сравнения и электролит помещают в стеклянную трубку из специального стекла с выдутым на конце тонкостенным стеклянным шариком (стеклянная проводящая мембрана). Такая конструкция образует внешний электрод сравнения. Потенциал внешнего электрода сравнения постоянен, а разность потенциалов, возникающая на стеклянной мембране, является функцией разности активностей селективных ионов в электролите внутри электрода и в исследуемом растворе.

Потенциал ионоселективного электрода определяется следующим образом:

$$E = K + \frac{RT}{z_i F} \ln \frac{a_i}{a'_i}$$

где

E – потенциал стеклянного электрода,

K – константа,

R – универсальная газовая постоянная,

F – постоянная Фарадея,

T – температура,

z_i – заряд иона i ,

a_i – активность ионов в исследуемом растворе,

a_i' – активность ионов в растворе электролита, заполняющем электрод.

Калиевый ионоселективный электрод имеет гидратированные внутреннюю и внешнюю поверхности стекла, из которого изготовлена мембрана. Внутренняя поверхность контактирует с насыщенным раствором KCl известной концентрации, а внешняя поверхность контактирует с раствором, в котором необходимо определить концентрацию ионов калия. Внешняя поверхность стекла калиевого ионоселективного электрода является ионообменником с более сильным сродством к ионам калия, чем к любым другим катионам. Это обеспечивается специальным составом стекла, из которого изготовлена стеклянная мембрана электрода. В результате адсорбции ионов калия на поверхности электрода создается положительно заряженный микроскопический слой, содержащий избыток ионов калия. Это и есть основная причина возникновения потенциала на границе раздела стекло-раствор.

Однако в целом система должна быть электронейтральной. Это значит, что положительный заряд катионов и отрицательный заряд анионов в общей массе раствора и на стекле равны.

Существует две границы раздела стекло-жидкость, одна из них разделяет стекло и исследуемый раствор, а другая – стекло и внутренний электролит. При этом одна из поверхностей стекла заряжена отрицательно по отношению к другой. Поскольку в исследуемом растворе концентрация ионов калия обычно меньше, чем в насыщенном внутреннем растворе, внешняя поверхность отрицательно заряжена по отношению к внутренней. Потенциал меняется только при изменении концентрации ионов калия в исследуемой среде.

В паре с ионоселективным электродом используют электрод сравнения с известным потенциалом, не зависящим от состава исследуемого раствора. Наиболее часто в качестве электрода сравнения используют каломельный электрод. Помещая индикаторный электрод, потенциал которого изменяется в зависимости от состава раствора, и электрод сравнения с постоянным потенциалом в исследуемый раствор, мы получим гальванический элемент. Электродвижущая сила этого элемента зависит от концентрации ионов, к которым чувствителен индикаторный электрод. ЭДС гальванического элемента такого вида измеряется потенциометром, а измерение концентрации селективных ионов называется потенциометрическим.

Ход работы:

Задание 1. Построение калибровочной кривой для K^+ - ионоселективного электрода.

1. Включить вольтметр и оставить для прогрева на 5 мин.
2. Используя исходный раствор KCl (0,1M), приготовить набор растворов KCl (на физ. растворе) с известными концентрациями: 0,01M, 0,001M, 0,0001M, 0,00001M и нулевую пробу – чистый физ. раствор. Количество раствора в каждом из стаканов должно быть около 20 мл (остальное слить).

Для приготовления указанных растворов необходимо пользоваться чистой посудой, вымытой

дистиллированной водой. Между измерениями электроды нужно не менее двух раз промывать, окуная их в

3. Подставить под электроды стакан с физ. раствором и, подождав 3 мин, записать показания вольтметра.
4. Выполнить то же, что и в п. 3 для остальных растворов, начиная с наименьшей концентрации.
5. Окунуть электроды в стакан с дист. водой, сменить воду и оставить их так до следующего измерения.
6. Построить график зависимости потенциала от концентрации KCl в растворе.

Задание 2. Изучение проницаемости мембраны эритроцитов для ионов калия.

1. Налить в центрифужную пробирку 20 мл физ. раствора и добавить туда при помощи шприца 3 мл цельной крови.
2. На центрифужных весах тщательно уравновесить пробирки.
3. Вставить пробирки в диаметрально противоположные гнезда ротора центрифуги, завинтить крышку и центрифугировать 5 мин при 3000 об/мин.
4. Дождавшись пока ротор полностью остановится, извлечь пробирки из ротора, а надосадочную жидкость вылить (если надосадочная жидкость окажется окрашенной, то необходимо повторить отмывание).
5. Добавить к осажденной эритроmasсе 10 мл физ. раствора и аккуратно перемешивать стеклянной палочкой до тех пор, пока на дне пробирки не останется эритроцитов. В момент добавления физ. раствора заметить время.
6. Уравновесить пробирки на центрифужных весах и центрифугировать как в п. 3.
7. Надосадочную жидкость аккуратно слить в стакан и измерить концентрацию ионов калия в нем.
8. После измерения, вылить жидкость обратно в пробирку, перемешать палочкой, уравновесить и снова центрифугировать.
9. Определить концентрацию в надосадочной жидкости (записать время).
10. Повторить опыт, как указано в пунктах 8-9 еще два раза, каждый раз записывая показания вольтметра и время с момента приготовления суспензии.
11. Построить кривую временной зависимости выхода ионов калия из эритроцитов.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Объяснить принцип определения концентрации ионов калия в растворе с помощью ионоселективного электрода.
2. Почему происходит выход ионов калия из эритроцитов в раствор при инкубировании клеток в физиологическом растворе?
3. Определение пассивного транспорта ионов через клеточную мембрану.
4. По каким каналам идет перенос ионов калия из клетки?

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА.

1. Черницкий Е.А., Воробей А.В. Структура и функции эритроцитарных мембран. - Минск: Наука и техника, 1981.- 215с.
2. Антонов В.Ф., Черныш А.М. и др. Биофизика.- М.: Владос, 2000.- 287 с.
3. Тиманюк В.А. Биофизика.- К.: Профессинал, 2004.- 704 с.
4. Ремизов А.Н. Медицинская и биологическая физика.- М.: Высшая школа, 1987.- 638 с.
5. Чанг Р., Физическая химия с приложением к биологическим системам. – М.: Мир, 1980.- 660с.

Лабораторная работа №8 МЕТОД ЭЛЕКТРОКАРДИОГРАФИИ

Цель работы: ознакомиться с физическими основами формирования электрокардиограммы; изучить принцип работы электрокардиографа; получить практические навыки записи и анализа электрокардиограммы.

Необходимое оборудование и принадлежности: электрокардиограф, электроды для конечностей, раствор электролита, вата.

Подготовка к работе.

Повторить следующие вопросы:

6. Понятие электрического диполя. Электрический момент диполя.
7. Особенности строения сердца. Электрические структуры сердца.
8. Понятие потенциала действия. Механизм генерации потенциала действия в сердечной мышце.

Функционирование возбудимых тканей, в частности, сердечной мышцы сопряжено с электрическими явлениями в них. При возбуждении клеток происходит селективное изменение проводимости клеточных мембран для ионов. В результате чего возникают электрические токи направленные перпендикулярно плоскости мембраны (формирование потенциала действия) и продольные токи, обеспечивающие проведение возбуждения от одного кардиомиоцита к другому. Возбуждение клеток проводящей системы сердца характеризуется распространением волны возбуждения по сердечной стенке, то есть последовательной деполяризацией и реполяризацией мембран клеток.

Процесс распространения возбуждения по различным частям сердца имеет сложный характер. Основные элементы электрической структуры сердца – это *клетки водителя ритма (пейсмекерные клетки), специализированная проводящая ткань и исполнительные мышечные клетки предсердий и желудочков*. Пейсмекерные клетки с определенной частотой генерируют потенциалы действия, развивая процесс возбуждения в предсердиях. Поскольку предсердия отделены от желудочков фиброзной тканью, не способной проводить возбуждение, то импульс возбуждения передается в область предсердий с помощью атриовентрикулярной проводящей системы. Ткань атриовентрикулярной системы передает возбуждение достаточно медленно, поэтому возбуждение желудочков происходит с некоторой задержкой относительно предсердий. В сократительном миокарде распространение возбуждения от клетки к клетке имеет непрерывный характер, перемещаясь от эндокарда к эпикарду. Подобное строение ткани миокарда представляет собой так называемый **функциональный синцитий** и позволяет с этой точки зрения рассматривать сердце как одну клетку сложной формы.

При возбуждении и реполяризации клеток сердца возникает электрическое поле, которое можно зарегистрировать с поверхности тела.

При этом между различными точками тела создается разность потенциалов, изменяющаяся в соответствии с колебаниями величины и направления электрического поля сердца. Метод исследования работы сердца, основанный на регистрации изменяющихся во времени потенциалов электрического поля на поверхности тела называется **электрокардиографией**.

Потенциал действия, возникая и распространяясь в различных структурах сердца, создает в нем переменное электрическое поле, а, следовательно, переменную разность потенциалов, регистрируемую с поверхности тела. Скорость распространения возбуждения в сердце изменяется по направлению и величине. Это означает, что полное описание электрического состояния сердца, математическое описание распределения мембранных потенциалов по всему объему сердца в каждой клетке и описание изменения этих потенциалов во времени не возможно.

Корректное описание электрической активности сердца возможно в рамках теории Эйтховена. В соответствии с данной теорией сердце рассматривается как эквивалентный генератор тока (токовый диполь) и полагается, что токовый диполь (сердце) создает на поверхности тела электрическое поле, которое изменяется с изменением электрической активности сердца.

Основные положения теории Эйтховена.

1. Сердце рассматривается как электрический токовый диполь, имеющий момент $\vec{E}$. Вектор $\vec{E}$ является векторной суммой дипольных моментов различных микроучастков сердца. Этот результирующий вектор называется интегральным электрическим вектором сердца ($\vec{E} = \sum_{i=1}^n \vec{D}_i$).
2. Диполь помещен в однородную изотропную электропроводящую среду, которой являются ткани организма.
3. Вектор $\vec{E}$ меняется при работе сердца по величине и направлению. Это обусловлено последовательностью распространения возбуждения в различных отделах сердца по стенкам правого и левого желудочков к его основанию.
4. Разность потенциалов между точками на поверхности тела (например: правой и левой рукой) пропорциональна проекции вектора $\vec{E}$ на линию, соединяющую точки съема.
5. Левая рука, правая рука и левая нога образуют, так называемый треугольник Эйтховена и являются стандартными точками съема ЭКГ в I, II и III отведениях.

Физические основы метода электрокардиографии.

Для расчета потенциалов электрического поля, созданного генератором электрического тока в однородной проводящей среде, генератор представляют в виде токового электрического диполя. Диполь характеризуется электрическим моментом $\vec{E}$ – это векторная физическая величина, которая численно равна произведению модуля заряда на расстояние между зарядами и направлена от отрицательного заряда к положительному.

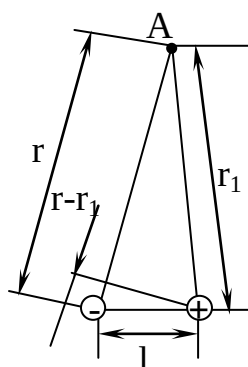


Рис. 1

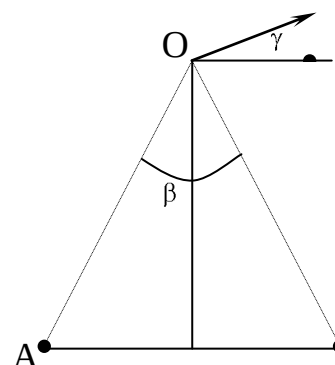


Рис. 2

Потенциал, создаваемый токовым генератором, в точке A (Рис. 1), удаленной от зарядов электрического диполя на расстояние r и r_1 равен:

$$\varphi = \frac{1}{4\pi\epsilon\epsilon_0} \frac{\vec{E} \cdot \cos \alpha}{r^2} \quad (1)$$

$\vec{E}$ – дипольный момент;

ϵ – относительная диэлектрическая проницаемость среды;

ϵ_0 – электрическая постоянная.

Разность потенциалов в двух точках A и B (Рис. 2) равноотстоящих от электрического диполя:

$$\varphi_B - \varphi_A = \frac{\sin(\beta/2)}{2\pi\epsilon\epsilon_0 r^2} E \cdot \cos \gamma \quad (2)$$

Из выражения (2) видно, что разность потенциалов в двух точках поля электрического диполя зависит от синуса половины угла, под которым видны эти точки от диполя, и от проекции электрического момента диполя на прямую, соединяющую точки.

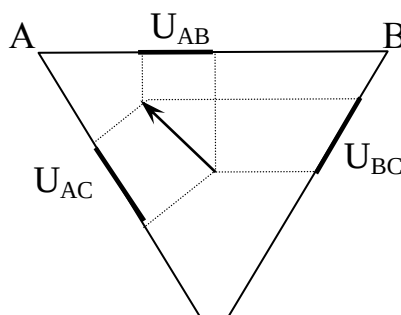


Рис. 3

Если диполь расположить в центре равностороннего треугольника (Рис. 3), то пары вершин треугольника будут видны, относительно диполя, под одним углом: $\beta_{AB}=\beta_{BC}=\beta_{AC}$.

Разности потенциалов в близлежащих вершинах равностороннего треугольника относятся как проекции вектора

$\vec{E}$ на его стороны:

$$U_{AB}:U_{BC}:U_{AC} = E_{AB}:E_{BC}:E_{AC} \quad (3)$$

или

$$U_{AB}:U_{BC}:U_{AC} = E \cos \alpha_{AB}:E \cos \alpha_{BC}:E \cos \alpha_{AC} \quad (4)$$

где α - угол между диполем и соответствующей стороной треугольника. Так как E является постоянной величиной,

выражение (4) можно переписать в виде

$$U_{AB}:U_{BC}:U_{AC} = |\cos \alpha_{AB}|:|\cos \alpha_{BC}|:|\cos \alpha_{AC}| \quad (5)$$

Зная напряжение U_{AB}, U_{BC}, U_{AC} можно определить, как ориентирован диполь относительно сторон треугольника. Из рисунка 3 видно, что

$$\alpha_{AC} = \frac{\pi}{3} - \alpha_{AB}, \quad \alpha_{BC} = \frac{2\pi}{3} - \alpha_{AB} \quad (6)$$

Из соотношения (5) следует, что

$$\begin{aligned} U_{AB} &= k \cos \alpha_{AB} \\ U_{BC} &= k \cos \alpha_{BC} \\ U_{AC} &= k \cos \alpha_{AC} \end{aligned} \quad (7)$$

где k - коэффициент пропорциональности, зависящий от свойств среды, дипольного момента и размеров треугольника.

Используя соотношение (6) и проделав тригонометрические преобразования, получаем:

$$\operatorname{tg} \alpha_{AB} = \frac{1}{\sqrt{3}} \cdot \frac{U_{AC} + U_{BC}}{U_{AC} - U_{BC}} \quad (8)$$

В соответствии с теорией Эйнтховена интегральный электрический вектор сердца расположен в центре равностороннего треугольника,

вершины которого условно расположены в правой руке, левой руке и левой ноге, так называемый треугольник Эйнтховена (Рис.4). Регистрация электрических потенциалов сердца осуществляется при помощи электродов. Электрод можно рассматривать как устройство, отводящее потенциал поля, благодаря чему регистрируемый в некоторой точке поверхности тела, потенциал получил название **отведения**. Напряжение между двумя электродами, размещенными на поверхности тела, – **сигнал отведения** зависит от расположения электродов и вектора сердца, от электрических характеристик тела. Таким образом, сигнал отведения можно трактовать как *скалярное произведение вектора сердца на вектор отведения, учитывающий геометрическую структуру и электрическую неоднородность тела*. Наиболее широко применяются **стандартные отведения**. Электроды **стандартных отведений, или отведений от конечностей**, устанавливаются на поверхности рук и ног (на запястьях и лодыжках). В качестве нулевого электрода обычно используют электрод отведения от правой ноги, который заземляют для того, чтобы уменьшить случайные шумы. Подключенные попарно к измерительному прибору отведения от остальных конечностей образуют систему, состоящую из трех **сигналов отведений** U_1, U_2, U_3 :

$$U_1 = \varphi_{LA} - \varphi_{RA}$$

$$U_2 = \varphi_{LL} - \varphi_{RA}$$

$$U_3 = \varphi_{LL} - \varphi_{LA}$$

где индексы RA, LA и LL означают правую руку, левую руку и левую ногу соответственно. Напряжения отведений U_1, U_2, U_3 можно найти путем проектирования вектора сердца $\vec{E}$ на соответствующий вектор отведения и умножения на модуль вектора отведения.



Рис.4. Треугольник Эйнтховена. Схема формирования зубцов ЭКГ в трех стандартных отведениях

Полный цикл работы сердца включает в себя возбуждение предсердий, деполяризацию желудочков и реполяризацию желудочков. Мгновенные значения интегрального электрического вектора сердца изменяются как по величине, так и по направлению таким образом, что при неизменной точке начала векторов, концы их описывают последовательно три петли определенной конфигурации. Этим трем петлям в ЭКГ в любом отведении (в норме) соответствуют три пика **P**, **QRS**, **T**. Для любого выбранного момента времени направление и модуль интегрального электрического вектора сердца имеет определенную величину, но проекции этого вектора на три отведения различны (Рис.4).

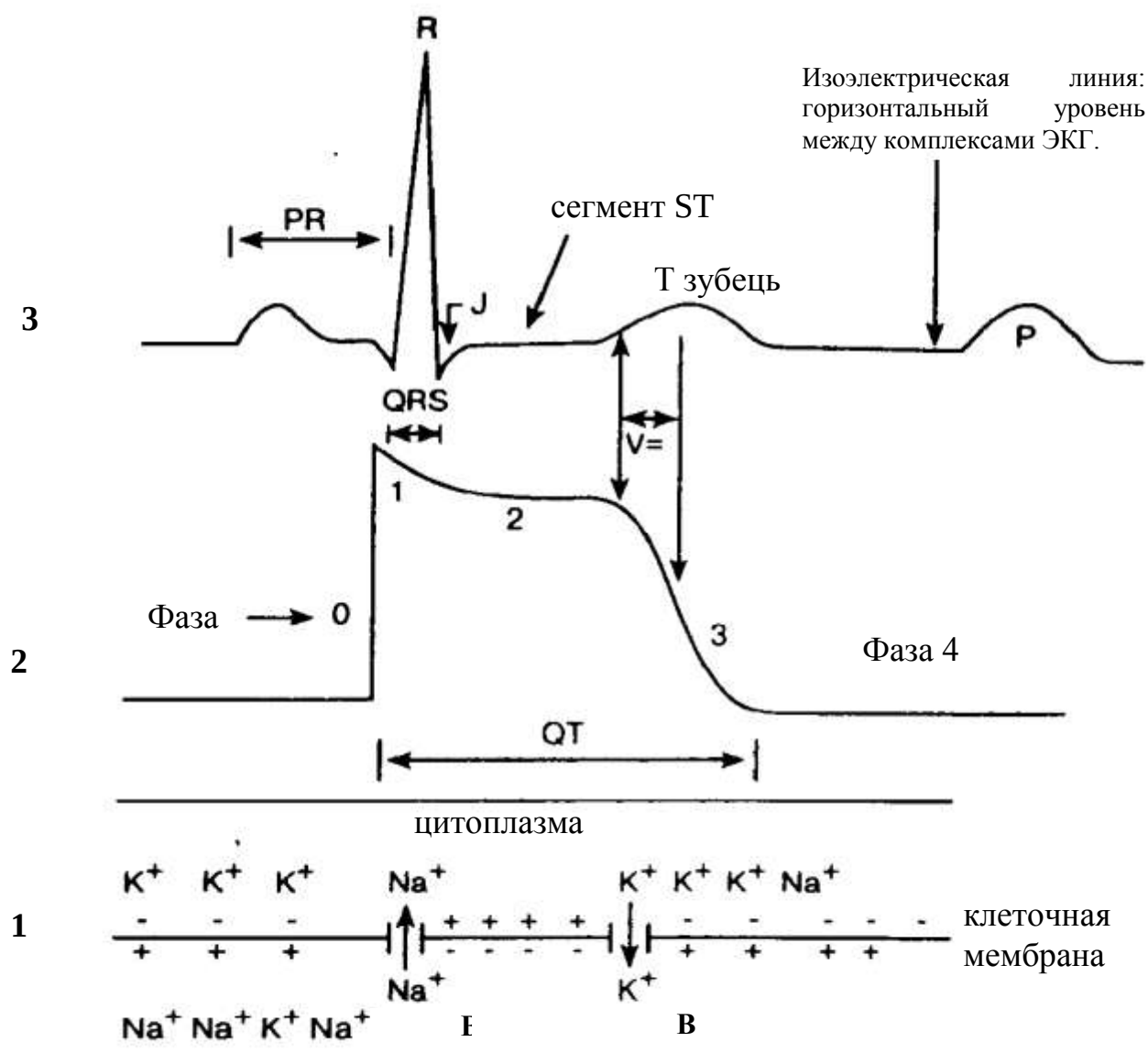


Рис. 5. Схематическое изображение ионного транспорта (1), формирование потенциала действия (2) в структурах сердца и отображение этого процесса на электрокардиограмме (3).

Пики ЭКГ называются *зубцами*. Зубец *P* соответствует деполяризации обоих предсердий, комплекс *QRS* отражает деполяризацию желудочков, а зубец *T* совпадает по времени с реполяризацией желудочков.

Основными характеристиками ЭКГ являются форма и высота зубцов, а также длительность временных интервалов между ними. При патологических изменениях в сердце происходит изменение этих характеристик, что позволяет использовать электрокардиограммы для диагностики заболеваний сердца. Клиническая диагностика по электрокардиограмме в большинстве случаев основана на оценке морфологии QRS комплекса и характера его повторения во времени для

последовательных сердечных циклов.

Длительность интервала **P-R** (от начала зубца Р до начала комплекса QRS) характеризует время проведения возбуждения между предсердиями и желудочками. Нулевая, или изопотенциальная, линия определяется сегментом **T-P** (от конца зубца Т до начала зубца Р следующего сердечного цикла). Сегмент **S-T** в нормальных условиях находится на уровне изопотенциальной линии, отклонение от которой также может свидетельствовать о нарушениях работы сердца. Интервал **Q-T** указывает полную длительность электрической систолы желудочков. Частота сердцебиений определяется как величина, обратная длительности интервала **R-R**.

По высоте зубцов ЭКГ, можно определить угол α , образованные вектором дипольного момента сердца с линией отведения 1:

$$\operatorname{tg} \alpha = \frac{1}{\sqrt{3}} \cdot \frac{U_2 + U_3}{U_2 - U_3} \quad (9)$$

Угол α определяет направление моментной электрической оси сердца. В тот момент времени, когда дипольный момент сердца принимает максимальное значение (зубец R на ЭКГ), направление дипольного момента (электрическая ось сердца) совпадает с его анатомической осью. На основании этого, используя электрокардиограмму, определяют положение анатомической оси сердца.

ОПИСАНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ СХЕМЫ ЭЛЕКТРОКАРДИОГРАФА

Функциональная схема электрокардиографа одноканального электрокардиографа ЭК1К-01 изображена на рис.3.

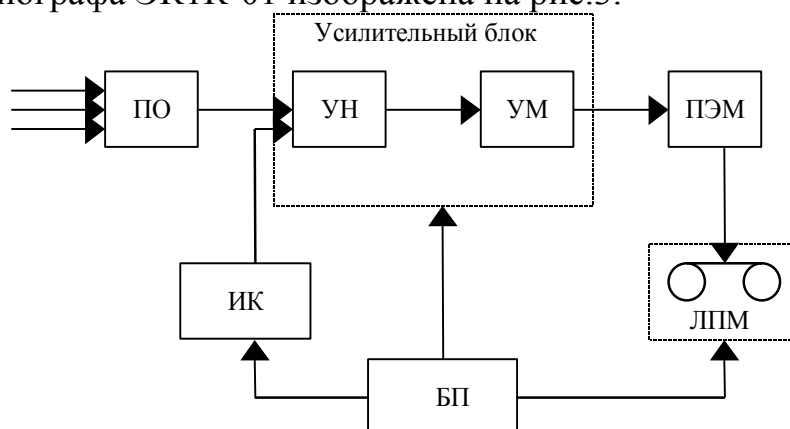


Рис.3 Схема электрокардиографа.

Биоэлектрические сигналы через кабель отведений и переключатель отведений (ПО) подаются на вход усилителя напряжения (УН). Усиленный сигнал с выхода УН подается на вход усилителя мощности (УМ), после которого сигнал поступает на электроомеханический преобразователь (ПЭМ), управляющий перемещением пера самописца. Лентопротяжный механизм (ЛПМ) обеспечивает равномерную скорость прокрутки диаграммной ленты. На вход усилителя напряжения с целью калибровки шкалы диаграммной ленты от источника

калибровочного напряжения (ИК) может быть подключено калибровочное напряжение. Питание всех узлов электрокардиографа обеспечивает блок питания (БП).

Основные регулировки электрокардиографа:

- выключатель сети;
- переключатель отведений;
- переключатели чувствительности;
- регулировка смещения пера самописца;
- переключатель скорости перемещения диаграммной ленты;
- кнопка записи.

Ход работы:

Задание 1. Регистрация электрокардиограммы

1. *Внимательно изучить конструкцию, назначение и расположение органов регулировки электрокардиографа.*
2. *Подготовить электрокардиограф к работе.*

Первоначально необходимо убедиться, что выключатель сети находится в положение **ОТКЛЮЧЕНО**, а гнездо заземления, расположенное на задней стенке электрокардиографа, соединено с заземляющей шиной.

Произведите первоначальные установки:

- переключатель отведений установите в положение 0;
- переключатель чувствительности установите в положение **10 мм/мВ**;
- переключатель скорости перемещения диаграммной ленты в отжатом состоянии установить в положение **25 мм/с**.

Включите электрокардиограф в сеть, установите электроды в соответствии со схемой стандартных отведений и подключите провода кабеля отведений к электродам (или к выходу имитатора ЭКГ). Для снятия электрокардиограммы по системе стандартных отведений электроды накладываются на внутренние поверхности предплечий и голени пациента. Для лучшего контакта с электродом на кожу помещаются прокладки из марли, смоченные 10%-ным раствором поваренной соли.

Провода кабеля отведений соединяются с электродами в следующем порядке: красный – к электроду на правой руке, желтый – к электроду на левой руке, зеленый – к электроду на левой ноге, черный – к электроду на правой ноге;

Подключить кабель отведений к разъему электрокардиографа.

3. *Произвести запись электрокардиограммы.*

Установите перо на середину поля записи регулятором смещения пера.

Включите режим калибровки, установив переключатель «V» в нажатое положение. Кратковременно нажимая кнопку записи, зафиксируйте уровень калибровочного напряжения (**1мВ**) на диаграммной ленте.

Запишите ЭКГ от трех стандартных отведений, соответственно изменяя положение переключателя отведений.

Если амплитуда ЭКГ в каком-либо из отведений выходит за пределы поля записи или слишком мала, то следует изменить чувствительность, поставив переключатель чувствительности соответственно в положение 5 или 20 мм/мВ, и снова записать калибровочные импульсы.

Задание 2. Определение основных параметров ЭКГ

1. Измерьте для каждого отведения высоты h зубцов ЭКГ. На этих данных и известной чувствительности S электрокардиографа по формуле $U=h/S$ вычислите разность потенциалов, соответствующую каждому зубцу. Результаты измерений и вычислений занесите в таблицу 1:

Таблица 1

Условное обозначение зубца ЭКГ	h, [мм]			S, [мм\мВ]			U, [мВ]		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
P									
R									
S									
T									

2. Используя данные таблицы 1, по формуле (9) рассчитайте угол α .
3. Измерьте расстояния l между соответствующими зубцами и для известной скорости v движения ленты по формуле $t = \frac{l}{v}$ вычислите длительности t временных интервалов ЭКГ для отведения 1. Результаты измерений и вычислений занесите в таблицу 2:

Таблица 2

Условное обозначение интервала	V [мм/с]	l [мм]	t [с]
R–R			
P–Q			
Q–R–S			
S–T			
Q–T			

4. По данным таб.2 определите частоту пульса.

Задание 3. Изучение влияния качества электродов и помех на ЭКГ.

1. Замените под электродом правой руки мокрую прокладку сухой и запишите ЭКГ в отведении 1. Учитывая установленную чувствительность S , по ЭКГ определите амплитуду помехи.
2. Проверьте установку пера на середине поля записи и начните запись ЭКГ в отведении 1. Во время записи пациент должен слегка сжимать и разжимать пальцы руки. Определите амплитуду отклонения записи от нулевой линии для этого случая.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Определение потенциала действия, его функции в организме.
2. Графическое изображение потенциала действия, его основные характеристики.
3. Потенциал действия кардиомиоцита. Работа ионных каналов кардиомиоцита. Какие ионы принимают участие в формировании потенциала действия кардиомиоцита?
4. Перечислить элементы электрической структуры сердца.
5. Что обеспечивает непрерывный характер распространения возбуждения по проводящей системе сердца?
6. Основные положения теории Эйнтховена.
7. Что является причиной изменений величины и направления интегрального электрического вектора сердца за цикл его работы?
8. Что понимают под стандартными отведениями?
9. Почему амплитуды одних и тех же зубцов ЭКГ в один и тот же момент времени в различных отведениях не одинаковы?
10. Что представляет собой электрокардиограмма, и какую информацию дает анализ электрокардиограммы?
11. Дать описание функциональной блок-схемы электрокардиографа.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА

5. Ремизов А.Н. Медицинская и биологическая физика.- М.: Высшая школа, 1987.- 638 с.
6. Антонов В.Ф., Черныш А.М. и др. Биофизика.- М.: Владос, 2000.- 287 с.
7. Антонов В.Ф., Черныш А.М. и др. Практикум по биофизика.- М.: Владос, 2001.- 350 с.
8. Блохина М.Е. Руководство к лабораторным работам по медицинской и биологической физике.- М. : Дрофа, 2002.- 285 с.

Лабораторная работа №9

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ВЫСОКОЧАСТОТНОГО ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ПОЛЯ С ВЕЩЕСТВОМ

Цель работы: исследование теплового эффекта в результате воздействия переменного электрического поля УВЧ на проводники и диэлектрики.

Необходимое оборудование и принадлежности: аппарат для высокочастотной терапии, кюветы с электролитом и диэлектриком, термометр.

Подготовка к работе.

Повторить следующие вопросы:

1. Электрические свойства живых тканей.
2. Понятие электрического диполя. Поляризация диэлектриков в электрическом поле. Виды поляризации.
3. Понятие диэлектрической проницаемости. Дисперсия диэлектрической проницаемости.

Электрические свойства биологических тканей обусловлены их способностью проводить и накапливать электрический заряд под воздействием электрического тока и поэтому характеризуются как активным так и реактивным (емкостным) сопротивлением. Суммарное сопротивление биологических тканей называется импедансом. Емкостное сопротивление имеет частотную зависимость: $R_x = \frac{1}{\omega C}$, где ω – круговая частота тока. Это является одной из причин зависимости импеданса биологических тканей от частоты тока. Изменение импеданса обусловлено также зависимостью поляризации биологических тканей от периода действия переменного тока.

Под воздействием переменного электрического поля биологические ткани проявляют свойства, как проводников, так и диэлектриков.

Органические вещества (белки, жиры, углеводы), из которых состоят живые ткани, в чистом и сухом виде являются диэлектриками. Однако все ткани в организме содержат или омываются жидкостями (кровь, лимфа, тканевые жидкости), в состав которых, кроме органических коллоидов, входят растворы электролитов. Наличие этих жидкостей обуславливает проводящие свойства биологических тканей.

Теоретические сведения.

Величина взаимодействия внешнего переменного электрического поля со средой зависит от электрических свойств этой среды – *электрической проводимости (κ) и диэлектрической проницаемости (ϵ).*

Под **проводимостью** понимают способность среды проводить электрический ток. Проводимость обусловлена наличием свободных носителей заряда, поэтому величина κ в первую очередь зависит от концентрации свободных носителей заряда в среде. В биологических средах в качестве свободных носителей заряда выступают ионы. Такой механизм проведения электрического тока имеет название **ионного** или **электролитического**. В том случае, если заряженные частицы при движении в каком-либо направлении не могут преодолеть потенциальный энергетический барьер, то они считаются **связанными**. Связанными зарядами являются заряды, входящие в состав атомов и молекул среды. Среда, в которых количество связанных зарядов превышает количество свободных носителей заряда, являются слабопроводящими средами и характеризуются диэлектрическими свойствами.

При помещении электролитов во внешнее переменное электрическое поле УВЧ-диапазона в среде устанавливается направленное движение ионов с образованием внутренних токов. Процессы проводимости сопровождаются потерями электрической энергии в виде тепла, за счет внутреннего трения при направленном движении частиц. Количество теплоты, выделенное в электролит:

$$q_1 = \frac{E^2}{\rho} \quad (1)$$

E - эффективное значение напряженности электрического поля;

ρ - удельное сопротивление электролита.

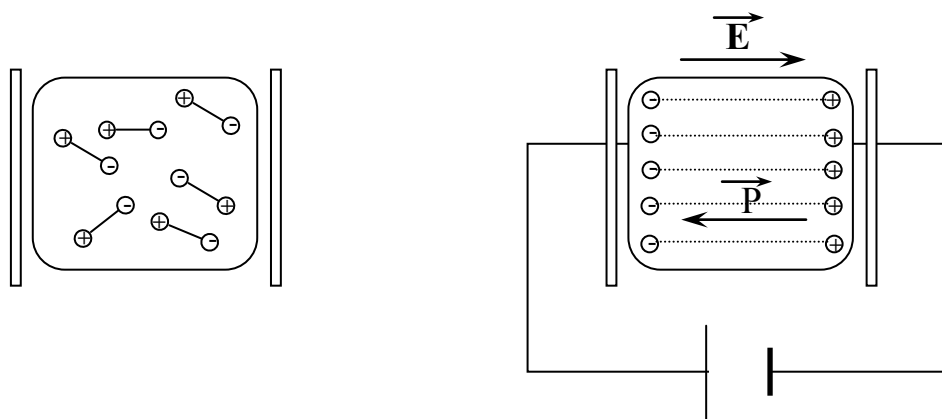


Рис. 1

При помещении диэлектриков во внешнее переменное электрическое поле УВЧ-диапазона происходит смещение связанных зарядов в пространстве, причем заряды, имеющие разные знаки, смещаются в противоположных направлениях. В результате смещения связанные

заряды создают в среде поле $\vec{P}$, противоположно направленное внешнему полю $\vec{E}$ (Рис.1). Это явление называется **поляризацией диэлектрика**. Создаваемое внутреннее поле $\vec{P}$ будет уменьшать напряженность внешнего электрического поля. Величина, показывающая во сколько раз уменьшается напряженность электрического поля в диэлектрике, называется **диэлектрической проницаемостью**. Постоянная диэлектрической проницаемости характеризует способность вещества ослаблять внешнее электрическое поле или другими словами способность его к поляризации.

Поляризация в среде устанавливается не мгновенно вслед за включением внешнего поля, а требует определенного времени для достижения равновесного значения. Время, в течение которого происходит образование и ориентация диполей вдоль силовых линий электрического поля, называется **временем релаксации поляризации**.

Под действием высокочастотного электрического поля в диэлектрике происходит непрерывная переориентация дипольных молекул. При этом, если время релаксации поляризации среды больше периода колебаний внешнего электрического поля, то диполи не успевают ориентироваться вдоль силовых линий электрического поля, и будут осуществлять колебательные движения. За счет сил внутреннего трения при колебательном движении диполей в среде диэлектрика происходит потеря электрической энергии в виде тепла. Количество теплоты выделенное в диэлектрике:

$$q_2 = wE\varepsilon\varepsilon_0tg\delta \quad (2)$$

w - круговая частота колебаний;

ε - относительная диэлектрическая проницаемость диэлектрика;

ε_0 - электрическая постоянная;

E - напряженность поля;

δ - угол диэлектрических потерь.

Тепловые потери, возникающие в результате ориентационных эффектов электрических диполей во внешнем переменном электрическом поле, называются **диэлектрическими потерями**.

Под воздействием поля УВЧ биологические ткани проявляют свойства, как проводников, так и диэлектриков, поэтому в тканях будет выделяться теплота в количестве равном:

$$q = q_1 + q_2 \quad (3)$$

В диэлектриках выделяют следующие виды поляризации с характерными для них временами релаксации:

- электронная (10^{-16} - 10^{-14} с);
- ионная (10^{-14} - 10^{-12} с);
- ориентационная (10^{-13} - 10^{-7} с);

- макроструктурная (10^{-8} - 10^{-3} с);
- поверхностная (10^{-3} - 10^0 с);

Если полупериод переменного тока больше времени релаксации какого-либо вида поляризации, то эффективная диэлектрическая проницаемость и проводимость объекта не будут изменяться с частотой. Если с ростом частоты полупериод переменного тока становится меньше времени релаксации, диэлектрическая проницаемость начинает уменьшаться с частотой, а проводимость - возрастать. С ростом частоты переменного поля период электрических колебаний уменьшается. Виды поляризации с большими временами релаксации не будут проявляться, тогда величину диэлектрической проницаемости будут определять другие виды поляризации с меньшими временами релаксации. Поэтому с ростом частоты будет уменьшаться величина диэлектрической проницаемости. Частотная зависимость диэлектрической проницаемости называется ***дисперсией диэлектрической проницаемости***.

Запаздывание изменения поляризованности среды относительно изменения напряженности электрического поля зависит от механизма поляризации данной среды. В биологических тканях выделяют три области дисперсии диэлектрической проницаемости:

α -дисперсия занимает область низких частот (до 10 кГц). Уменьшение диэлектрической проницаемости биологических систем в данной области обусловлено поляризацией целых клеток в результате диффузии ионов (уменьшается эффект поляризации поверхности клеток). Для токов низкой частоты клетка обладает высоким сопротивлением, поэтому воздействие электрического поля проявляется только на уровне межклеточного пространства. Электрические свойства биологических объектов в области α -дисперсии объясняется эффектом поверхностной поляризации.

β -дисперсия наблюдается в области частот 10 - 10^4 кГц. На данных частотах на переменное электрическое поле успевают реагировать биологические макромолекулы (например, белки), поскольку имеют значительную массу. Электрические свойства биологических объектов в области β -дисперсии объясняется эффектом макроструктурной поляризации.

γ -дисперсия наблюдается в области выше 10^6 кГц. Уменьшение диэлектрической проницаемости в этом диапазоне обусловлено ослаблением эффекта ориентационной поляризации, вызываемого диполями воды. Величина γ -дисперсии будет зависеть от содержания свободной воды в исследуемых тканях.

Общая картина частотной зависимости электрических параметров сохраняется для всех типов тканей, что обусловлено единством структуры и химического состава клеток. В каждом конкретном случае индивидуальные особенности объектов обуславливают характер частотной зависимости. К таким особенностям относятся размеры и форма клеток,

величина их проницаемости, соотношение между объемом клеток и межклеточных пространств, содержание свободных ионов в клетках, содержание свободной воды и т.д.

Биологическое действие полей УВЧ

В биологии и медицине принято следующее условное разделение электромагнитных колебаний на частотные диапазоны (таблица).

Таблица 25

Низкие (НЧ)	до 20 Гц
Звуковые (ЗЧ)	20 Гц — 20 кГц
Ультразвуковые или надтональные (УЗЧ)	20 кГц — 200 кГц
Высокие (ВЧ)	200 кГц — 30 МГц
Ультравысокие (УВЧ)	30 МГц — 300 МГц
Сверхвысокие (СВЧ)	300 МГц — 300 ГГц
Крайневысокие (КВЧ)	свыше 300 ГГц

Одним из распространенных физиотерапевтических методов является УВЧ-терапия – воздействие на ткани и органы переменным электрическим полем ультравысокой частоты (30 – 300 МГц). УВЧ-терапия применяется при лечении воспалительных процессов в костях и суставах, невралгии, бронхиальной астмы и других заболеваний.

Общее действие электрического поля УВЧ условно можно разделить на специфическое и тепловое. **Специфическое действие** обусловлено релаксационными колебаниями глобулярных белков, гликопротеидов, гликолипидов, фосфолипидов клеточных мембран, характеристические частоты которых соответствуют области β -дисперсии биологических тканей. При этом доля энергии, затраченная на структурные перестройки молекулярных комплексов, значительно превышает энергию идущую на общий нагрев ткани, и физиологические механизмы теплопередачи оказываются в состоянии утилизировать выделяемое тепло. Конформационные изменения молекулярных комплексов, в свою очередь, приводят к увеличению дисперсности белков и фосфолипидов, что отражается на биохимической активности первых и увеличении проницаемости мембранных структур в целом. В результате этого происходит активация различных ион-транспортных систем, процессов свободно-радикального и ферментативного окисления. На этой основе формируются неспецифические метаболические реакции клеток, определяющие лечебный эффект действия УВЧ, как то увеличение гемопоэза, усиление фагоцитарной активности лейкоцитов, стимуляция иммуногенеза.

Тепловое действие обусловлено тем, что удельная мощность тепловыделения (в результате колебательного и вращательного движений частиц в вязкой среде) превышает мощность, отводимую с помощью механизмов теплопередачи (теплопроводность, конвекция, испарение и излучение), т.е. физиологические механизмы теплопередачи оказываются не в состоянии отводить все выделяемое тепло и, как следствие этого, происходит разогрев ткани. Ткани, насыщенные водой (кровь, лимфа, мышечная ткань), обладают в этом частотном диапазоне значительным значением ϵ и κ ; тем не менее их нагрев происходит на порядок меньше по

сравнению с тканями с пониженным содержанием воды (нервная, костная, соединительная ткани, подкожная жировая клетчатка), что связано с высокой теплопроводностью первых. Нагревание органов и тканей под действием электрического поля УВЧ вызывает расширение капилляров и увеличение скорости кровотока, повышает проницаемость эндотелия и ускоряет лимфодинамику. Основу формирования общей реакции организма составляет возбуждение различных энтеро- и интерорецепторов и физико-химических изменений в них. В частности под влиянием УВЧ повышается тромбобластическая активность плазмы и гиперкоагуляция.

Поскольку выделяемая теплота зависит от диэлектрической проницаемости тканей и их удельного сопротивления, то, подбирая соответствующую частоту, можно осуществить преимущественное выделение теплоты в нужных тканях и органах. Более того, комбинированное действие токов проводимости и токов смещения соответствующих частот позволяет селективно производить нагрев этих тканей и органов.

ОПИСАНИЕ УСТАНОВКИ ДЛЯ УВЧ-ТЕРАПИИ

Аппарат для УВЧ-терапии УВЧ-66, блок-схема которого показана на рисунке 2, состоит из двух основных частей: лампового генератора (ЛГ) и терапевтического контура (ТК). Генератор вырабатывает электрические колебания частотой 40,58 МГц. Терапевтический контур индуктивно связан с анодным колебательным контуром генератора и включает в себя дисковые электроды пациента (ЭП), с помощью которых осуществляется воздействие электрическим полем УВЧ на пациента, и переменного конденсатора настройки. Индуктивная связь исключает возможность попадания больного под высокое напряжение, используемое в генераторе.

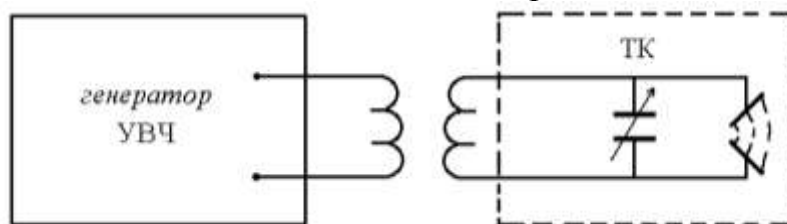


Рис.2. Блок-схема аппарата для УВЧ-терапии.

Наибольшая мощность выделяется в терапевтическом контуре при условии резонанса, т.е. когда частота собственных колебаний терапевтического контура совпадает с частотой генератора. Собственная частота колебательного контура зависит от его индуктивности L и емкости C :

$$\omega = \frac{1}{\sqrt{LC}}$$

Емкость терапевтического контура складывается из емкости между электродами пациента и емкости переменного конденсатора C_n . Так как при различных процедурах емкость между электродами пациента

меняется, то каждый раз необходимо производить настройку терапевтического контура в резонанс, изменяя емкость переменного конденсатора.

На передней панели прибора расположены следующие элементы управления:

- переключатель **НАПРЯЖЕНИЕ** служит для обеспечения рабочего режима аппарата в условиях отклонения напряжения в сети от номинального;

- кнопка **КОНТРОЛЬ** позволяет осуществить контроль напряжения сети при нажатии;

- переключатель **МОЩНОСТЬ**, имеющий четыре положения: 0, 20, 40, 70 Вт, служит для изменения мощности поля, создаваемой генератором;

- ручка **НАСТРОЙКА** изменяет емкость переменного конденсатора терапевтического контура. Контроль настройки терапевтического контура осуществляется с помощью стрелочного измерительного прибора.

На правой боковой стенке аппарата укреплены два кронштейна для установки электрододержателей, имеющих шарнирные соединения, которые позволяют установить электроды в различные положения.

Распределение напряженности электрического поля между электродами пациента зависит от размеров электродов, расстояния между ними и от их взаимного расположения. Некоторые случаи показаны на рис.3

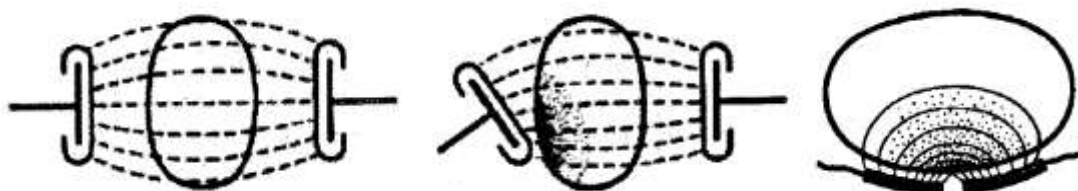


Рис.3

Во избежание ожогов токами высокой частоты ЗАПРЕЩАЕТСЯ подносить к проводам и электродам аппарата металлические предметы, а также заменять электроды и провода при включенном аппарате. Во время измерений не следует находиться слишком близко возле прибора.

Ход работы:

Перед началом выполнения работы внимательно изучите конструкцию, назначение и расположение органов настройки аппарата УВЧ-66. Необходимо убедиться в том, что аппарат имеет заземление, а переключатель **НАПРЯЖЕНИЕ** находится в положении **ВЫКЛ.** Во избежание ожогов токами высокой частоты запрещается подносить к проводам и электродам аппарата металлические предметы, а также заменять электроды и провода при включенном аппарате.

Задание 1. Исследование пространственного распределения электрического поля УВЧ.

Это распределение можно исследовать с помощью дипольной антенны, представляющей собой два проводника, между которыми включен полупроводниковый диод. Сила тока, возникающего в контуре дипольной антенны, пропорциональна напряженности электрического поля УВЧ. Дипольная антенна располагается на деревянной рейке, которая может двигаться в вертикальном и горизонтальном направлениях по направляющим с метрической шкалой.

1. Установить электроды на расстоянии, заданном преподавателем, и расположить в центре между ними дипольную антенну. При этом миллиамперметр, подключенный к антенне, должен находиться как можно дальше от электродов аппарата.
2. Включить аппарат УВЧ, для чего переключатель *НАПРЯЖЕНИЕ* поставить в положение 1. При этом должна загореться сигнальная лампочка. Нажимая кнопку *КОНТРОЛЬ* и вращая переключатель *НАПРЯЖЕНИЕ*, установить стрелку индикатора аппарата на середину красного сектора.
3. Установить переключатель *МОЩНОСТЬ* на заданное значение и ручкой *НАСТРОЙКА* добиться максимального отклонения стрелки индикатора;
4. Перемещая дипольную антенну в горизонтальном направлении влево и вправо от центра на расстояние ℓ_x , через каждый сантиметр измерять силу тока I ;
5. Перемещая дипольную антенну в вертикальном направлении вверх и вниз от центра на расстояние ℓ_y , через каждый сантиметр измерять силу тока I ;
6. Результаты измерений занести в табл. 1:

Таблица 1

<i>Горизонтальная плоскость</i>				<i>Вертикальная плоскость</i>			
ℓ_x , см	I , мА	ℓ_x , см	I , мА	ℓ_y , см	I , мА	ℓ_y , см	I , мА

7. Построить графики зависимости силы тока I от положения антенны ℓ_x и от ℓ_y .

Задание 2. Получение резонансных кривых терапевтического контура.

1. Установить электроды пациента на расстоянии 10 см и поместить дипольную антенну в центре между ними; вывести ручку настройки в крайнее левое положение.
2. Вращая ручку *НАСТРОЙКА*, через каждое деление n шкалы настройки

- снять показания миллиамперметра I при изменении положения ручки;
3. Провести аналогичные п.2 измерения при расстоянии между электродами, равном 20 см.
4. Результаты измерений занести в табл. 2:

Таблица 2

n	I , мА (10 см)	I , мА (20 см)

1. Постройте графики зависимости силы тока I от положения n переключателя *НАСТРОЙКА* для двух различных расстояний между электродами.

Задание 3. Исследование теплового воздействия поля УВЧ на электролиты и диэлектрики:

Для изучения теплового воздействия электрического поля УВЧ на электролиты и диэлектрики между электродами устанавливаются кюветы из оргстекла с исследуемыми жидкостями. Количество жидкости в кюветах подбирается так, чтобы их теплоемкости были одинаковы. Изменение температуры определяется по показанию термометра.

1. Поместить кювету с физиологическим раствором между электродами аппарата и измерить начальную температуру T_1 жидкости в кювете.
2. Включить аппарат и настроить терапевтический контур в резонанс.
3. Снимать показания термометра с каждым изменением температуры на 1°C . Регистрировать изменения температуры по достижению 45°C . Результаты измерений занести в таблицу:
5. Повторить действия пп 1-4, взяв в качестве образца вместо физиологического раствора раствор сахарозы, а затем растительное масло.
6. Построить график зависимости температуры T исследуемых жидкостей от времени t воздействия на них электрического поля УВЧ.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ:

1. Электропроводность биологических тканей.
2. Поляризация тканей. Дисперсия диэлектрической проницаемости, области дисперсии.
3. Механизм взаимодействия переменного электрического поля УВЧ диапазона с электролитами.
4. Механизм взаимодействия переменного электрического поля УВЧ диапазона с диэлектриками.
5. Механизм теплового действия УВЧ электрического поля на электролиты и диэлектрики.

6. Что понимают под электрической проводимостью и диэлектрической проницаемостью среды?
7. Какие явления называют поляризацией и релаксацией среды?
8. Чем обусловлена дисперсия электрических характеристик биологических тканей?
9. Какова природа теплового эффекта действия переменных электрических полей на среду и от каких свойств среды зависит величина этого эффекта?
10. Каковы особенности электрических свойств биологических тканей?
11. Почему нагрев тканей с пониженным содержанием воды более сильный?

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА

9. Ремизов А.Н. Медицинская и биологическая физика М.: Высшая школа, 1987.- 638 с.
10. Антонов В.Ф., Черныш А.М. и др. Биофизика М.: Владос, 2000.- 287 с.
11. Антонов В.Ф., Черныш А.М. и др. Практикум по биофизике М.: Владос, 2001.- 350 с.
12. Блохина М.Е. Руководство к лабораторным работам по медицинской и биологической физике М. : Дрофа, 2002.- 285 с.
13. Губанов Н.И Медицинская биофизика.- Медицина, 1978.

Лабораторная работа №10

МЕТОД КИСЛОТНЫХ ЭРИТРОГРАММ. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ЭРИТРОЦИТОВ ПО СТОЙКОСТИ.

Цель работы : метод кислотных эритрограмм изучить распределение эритроцитов по стойкости в норме и под воздействие физического фактора, получить и проанализировать дифференциальную и интегральную эритрограммы.

Необходимое оборудование, принадлежности и материалы: фотоэлектрический колориметр КФК, секундомер, пробирки, стеклянные палочки и пипетки; физиологический раствор, эритромаасса, гемолитик (0,002 М раствор HCl, приготовленный на физрастворе).

Подготовка к работе.

Повторить следующие вопросы:

1. Особенности строения эритроцитарной мембраны.
2. Оптические свойства биомакромолекул плазматических мембран эритроцитов.
3. Принцип фотоэлектроколориметрических измерений процесса гемолиза эритроцитов.

Совокупность многих физико-химических свойств эритроцитов зависит от их состояния, которое характеризуется устойчивостью эритроцитов по отношению к повреждающим воздействиям. Например, известно, что устойчивость эритроцитов определяется их возрастом: молодые, выходящие из костного мозга эритроциты обладают наибольшей стойкостью и, наоборот, старые эритроциты являются малоустойчивыми. *В качестве критерия, определяющего стойкость эритроцитов, можно использовать их способность к гемолизу под действием гемолитических веществ. При этом мерой стойкости служит время гемолиза.* Время гемолиза также находится в прямой зависимости от концентрации гемолитика. Среди ряда гемолитиков наиболее стабильными являются неорганические кислоты. Известно, что гемолиз нормальной человеческой крови, вызываемый **0,002М** раствором HCl протекает **6÷8 мин.**

Кривая распределения эритроцитов по их стойкости носит название **эритрограммы.**

Метод кислотных эритрограмм. Сущность метода заключается в фотоколориметрии динамики распада эритроцитов под действием гемолитического вещества (соляной кислоты). Продолжительность гемолиза, протекающего при постоянной температуре и концентрации соляной кислоты служит мерой стойкости эритроцитов.

В результате измерений получается ряд убывающих во времени показаний оптической плотности D . Эта убыль оптической плотности во времени характеризует разрушение эритроцитов под воздействием гемолитического вещества и соответствует степени гемолиза с момента отсчета. Влияние различных факторов на эритроциты будет отражаться в изменении формы и сдвиге эритрограмм по сравнению с контролем.

Х о д р а б о т ы:

З а д а н и е 1. Выбрать условия проведения гемолиза для контрольного образца.

1. Подготовить прибор к работе (приложение 1):
установить красный светофильтр (670нм);
в кюветное отделение установить кювету ($d=5\text{мм}$) с физраствором и регулировкой чувствительности добиться показания прибора 100% по шкале Т.
2. Приготовить 1%-взвесь эритроцитов в физрастворе.
3. Во вторую кювету ($d=5\text{мм}$) поместить 1,5 мл гемолитика и добавить 0,7 мл однопроцентной взвеси эритроцитов. Засечь время по секундомеру и перемешать стеклянной палочкой до однородного состояния.
4. Установить кювету в свободный кюветодержатель и произвести измерение D . При этом значение оптической плотности должно составлять $0,7 \pm 0,1$. Если значение D не попадает в указанный интервал, то необходимо разбавить исходную взвесь эритроцитов физиологическим раствором. При этом количество ΔV физраствора, которое необходимо добавить в исходный объем V взвеси эритроцитов, можно оценить по формуле:

$$\Delta V = D / 0,7 - 1 \cdot V, \quad (1)$$

5. Заносить показания прибора в таблицу через равные интервалы времени (10s) вплоть до момента окончания гемолиза, о котором можно судить по прекращению изменения оптической плотности. При этом максимальная скорость изменения D должна наступить через 3÷4 мин. В том случае, если гемолиз происходит слишком быстро, необходимо уменьшить концентрацию HCl гемолитика. Если наоборот, гемолиз идет медленно, необходимо увеличить концентрацию HCl . Произвести повторные опыты и получить зависимость момента наступления максимальной скорости гемолиза от концентрации HCl .
6. Для концентрации гемолитика, соответствующей нормальному протеканию гемолиза, произвести повторное измерение контрольного образца. При этом интервалы времени регистрации показаний прибора на начальном и конечном этапах можно увеличить. Оценить погрешность эксперимента.

З а д а н и е 2. Построить дифференциальную и интегральную

эритрограммы для контрольного образца.

Для построения эритрограмм необходимо заполнить следующую таблицу:

Время, с	D_i	ΔD_i	$\% \Delta D_i$	$\% D_i$

в 1-ю колонку заносится время с момента отсчета;

во 2-ю - значение оптической плотности взвеси эритроцитов;

в 3-ю - разность между текущим и предыдущим значениями оптической плотности: $\Delta D_i = |D_i - D_{i-1}|$;

в 4-ю - процентное значение ΔD_i :

$$\% \Delta D_i = \frac{\Delta D_i}{\Delta D} \cdot 100, \quad (2)$$

где ΔD - величина, равная разности между начальным значением оптической плотности и значением оптической плотности после окончания гемолиза.

Данные 5-й колонки представляют собой результат последовательного суммирования данных 4-й колонки и могут определяться по формуле:

$$\% D_i = \frac{D_1 - D_i}{\Delta D} \cdot 100 \quad (3)$$

где D_i - показание оптической плотности в текущий момент времени.

Протекание гемолиза можно изобразить графически, построив временную зависимость $\% D_i$, отражающую нарастающий процент гемолизированных эритроцитов. Построенная кривая, имеющая S-образный вид, называется **интегральной эритрограммой**. Распределение эритроцитов по стойкости характеризует **дифференциальная эритрограмма**. **Дифференциальная эритрограмма** соответствует графическому представлению изменения во времени процента гемолизированных в течение определенного промежутка времени эритроцитов от общего их числа, т.е. соответствует кривой зависимости $\% \Delta D_i$ (данные 4-й колонки) от времени. Дифференциальную эритрограмму удобно использовать для анализа кривой распределения (определение основной группы стойкости, дисперсии по стойкости, асимметрии распределения относительно центра распределения).

З а д а н и е 3. Методом построения кислотных эритрограмм изучить действие физических факторов на эритроциты.

1. Подвергнуть исследуемую пробу эритроцитов воздействию физического фактора и получить для нее дифференциальную и интегральную эритрограммы.
2. Оценить повреждающее действие (ПД) по сдвигу центра распределения:

$$ПД = \frac{t_{м}^{контр} - t_{м}}{t_{м}} \cdot 100\% \quad (4)$$

где $t_{м}^K$ и $t_{м}$ - время гемолиза основной группы стойкости соответственно для контрольного и изучаемого образца (время, соответствующее максимальному значению ΔD_i для дифференциальной эритрограммы). Проанализировать повреждающее действие, используя представление об эритроцитах различных возрастов.

З а д а н и е 4. Получить непосредственную запись дифференциальной эритрограммы.

Принцип непосредственной записи дифференциальной эритрограммы состоит в измерении динамики изменения оптической плотности образца эритроцитов относительно образца, приготовленного при тех же условиях раньше на время Δt . Преимущество непосредственного способа записи заключается в том, что он позволяет избежать разброса значений ΔD_i , вызванного неодинаковыми интервалами времени при регистрации D_i в процессе гемолиза. Для каждого измерения независимо от текущего времени этот интервал будет постоянным и равен Δt ; таким образом, соблюдается требование равенства интервалов времени регистрации. Время Δt будет соответствовать интервалам регистрации показаний ФЭКа при обычной записи динамики гемолиза. Интервалы регистрации можно изменять, варьируя разность времени приготовления образцов. Выбору оптимального значения Δt соответствует интервал времени равный разности между моментом, когда скорость гемолиза наибольшая (время t_m , соответствующее максимальному значению ΔD_i для дифференциальной эритрограммы), и моментом времени t , когда это значение уменьшается вдвое. При нормальном протекании гемолиза $\Delta t = 30 \div 40$ с.

1. В две кюветы поместить по 1,5 мл гемолитика, отвечающего нормальному протеканию гемолиза.
2. В кювету № 1 добавить взвесь эритроцитов и перемешать. В момент добавления эритроцитов начать отсчет времени по секундомеру. После перемешивания измерить оптическую плотность относительно физраствора D_1 .
3. Через время Δt после начала отсчета добавить эритроциты в кювету № 2, перемешать и измерить оптическую плотность относительно физраствора D_2 . Главным требованием выполнения пп.2,3 является приготовление оптически идентичных образцов $D_2 = D_1$. Время Δt следует принять равным оптимальному значению, полученному из дифференциальной эритрограммы (зад.2).
4. Установить на место кюветы с физраствором кювету № 1 в качестве сравнительной, и регулировкой чувствительности добиться показания

прибора для нее **100%** по шкале **T**. Снять для кюветы № 2 показание оптической плотности и время по секундомеру. В том случае, если оказывается невозможным установить **100%** значение пропускания для кюветы №1, то следует установить максимально возможное значение пропускания и непосредственно перед каждым последующим измерением производить подстройку пропускания для кюветы №1 именно на это значение.

5. Провести измерение временной зависимости **D** для кюветы №1 относительно кюветы №2. Поскольку светопропускание в кювете №1, служащей контролем, с течением времени будет постоянно изменяться, то перед каждым последующим измерением необходимо производить подстройку показаний прибора для этой кюветы на **100 %** по шкале **T**. Количество измерений выбрать исходя из требования получения гладкой кривой. Отсутствие изменения разности показаний прибора для кювет № 1 и № 2 будет указывать на окончание гемолиза.

6. По окончании гемолиза заменить кювету № 1 кюветой с физраствором. Выставить для последней **100%** по шкале **T** и измерить оптическую плотность **D** для кюветы № 2.

7. Рассчитать процентное значение разности оптической плотности по формуле:

$$\% \Delta D = \frac{D}{\Delta D} \cdot 100, \quad (5)$$

где $\Delta D = D_n - D_k$ разность между абсолютными начальным и конечным значениями в кюветах № 1 и № 2. Построить зависимость **%ΔD** от времени.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ:

1. Какова связь между светопропусканием и оптической плотностью?
2. Какими параметрами можно охарактеризовать дифференциальную кислотную эритрограмму? Что они показывают?
3. Описать процесс гемолиза. Почему в его ходе изменяется оптическая плотность?

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА:

1. Терсков И.А., Гительзон И.И. Метод химических (кислотных) эритрограмм, *Биофизика*, 1957, т.2, вып.2, стр. 259-266.
2. Черницкий Е.А., Воробей А.В. Структура и функции эритроцитарных мембран.-Минск: Наука и техника, 1981.- 215с.

Лабораторная работа №11

ОПРЕДЕЛЕНИЕ РАЗМЕРОВ ЭРИТРОЦИТОВ МЕТОДОМ ДИФРАКЦИИ ЛАЗЕРНОГО ЛУЧА

Цель работы: Исследование явления дифракции света на сферических объектах, измерение длины волны лазерного излучения, определение размеров эритроцитов.

Необходимое оборудование, принадлежности и материалы: Оптическая скамья, лазер, держатели, линейка, дифракционная решетка, препарат эритроцитов крови, предметные стекла, стеклянные палочки.

Подготовка к работе.

Повторить следующие вопросы.

1. Явление дифракции света. Дифракция света на дифракционной решетке, ход лучей, вывод формул.
2. Дифракция света на сферических частицах.
3. Основные характеристики лазерного излучения.

Дифракцией называется огибание светом малых препятствий, сопровождающееся проникновением волны в область тени.

Дифракцию можно наблюдать, например, при прохождении света через систему щелей, расположенных на некотором расстоянии друг от друга – дифракционную решетку (рис. 1).

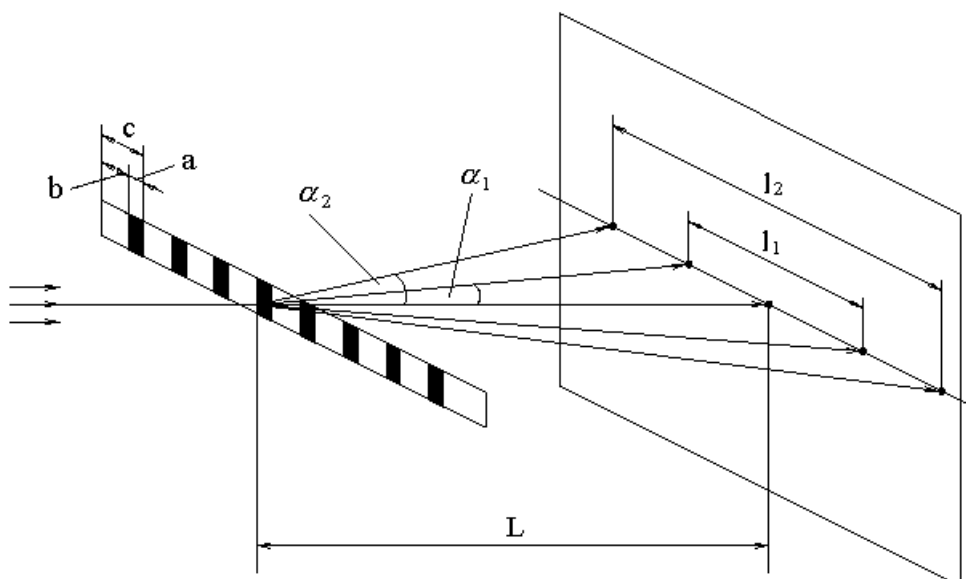


Рис. 1

Ширина щелей **a** и расстояние **b** между ними определяют период решетки **c=a+b**. При нормальном падении монохроматической волны

распределение интенсивности света за решеткой описывается формулой:

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

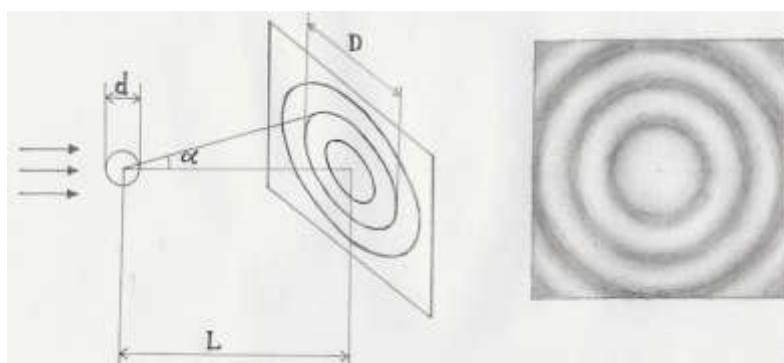
Где I_0 – интенсивность падающего света, λ – длина волны, N – число освещенных щелей дифракционной решетки.

Когда углы удовлетворяют условию:

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

функция $I(\alpha)$ принимает максимальные значения, которые называются главными максимумами. Они расположены симметрично относительно центрального максимума. Между ними располагаются $N-2$ добавочных максимумов, интенсивность которых значительно меньше (см. рис. 1).

Дифракцию можно наблюдать и при падении света на одиночный объект, например, сферу. В этом случае картина имеет вид чередующихся концентрических темных и светлых колец, окружающих светлый



центральный круг (рис. 2).

Первые несколько темных и светлых колец (минимумы и максимумы интенсивности излучения) получаются при следующих углах рассеяния света:

$$\sin \alpha_1 = p_1 \frac{\lambda}{d} - \text{минимум}, \quad \sin \alpha_2 = p_2 \frac{\lambda}{d} - \text{максимум},$$

$$\sin \alpha_3 = p_3 \frac{\lambda}{d} - \text{минимум}, \quad \sin \alpha_4 = p_4 \frac{\lambda}{d} - \text{максимум},$$

$$\sin \alpha_5 = p_5 \frac{\lambda}{d} - \text{минимум}. \quad \text{Рис. 2}$$

В этих формулах d – диаметр сферы, $p_1 = 1,22$, $p_2 = 1,64$, $p_3 = 2,22$, $p_4 = 2,68$, $p_5 = 3,24$ – корни функции Бесселя первого порядка.

Такая же дифракционная картина наблюдается и при освещении слоя

малых круглых частиц одинакового размера, расположенных хаотично.

Измерив углы α_n , можно определить диаметр частиц по следующей формуле:

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

Описание установки

Все детали установки располагаются на оптической скамье 1 (рис. 3). Источником света служит лазер 2. Его луч попадает на объект исследования, укрепленный в держателе 3. Дифракционная картина наблюдается на экране 4.

Чтобы определить длину волны излучения лазера необходимо знать период дифракционной решетки c , порядок максимума n и угол α_n . Период решетки указан на ее оправе.

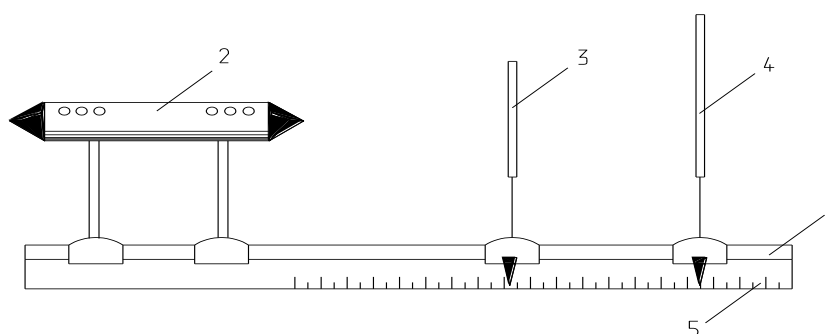


Рис. 3

Угол α_n можно найти по формуле:

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

Где L – расстояние между решеткой и экраном, l_n – расстояние между максимумами одного порядка, расположенными симметрично относительно центрального максимума. Длина волны, согласно формуле (2), равна:

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

Для определения размеров сферических частиц используется препарат эритроцитов крови. Диаметр эритроцитов вычисляется по формуле (3). Угол α_n находится из соотношения:

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

где D_n – диаметр дифракционного кольца, L – расстояние между

препаратом и экраном (рис. 2). Так как дифракционные кольца на экране получаются широкими, то

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

где $D_{\min}$ и $D_{\max}$ – внутренний и внешний диаметры кольца.

Значения коэффициентов p_n берутся соответственно номеру кольца, которые нумеруются, начиная с первого темного кольца, окружающего центральный светлый круг.

Порядок выполнения работы

Включать и настраивать лазер разрешается только в присутствии преподавателя или лаборанта!

Всякое перемещение лазера как во включенном, так и в выключенном состоянии студентам категорически воспрещается.

Попадание в глаза прямого лазерного излучения опасно, для зрения.

1. Определение длины волны излучения лазера.
 - 1.1. Укрепите в держателе 3 дифракционную решетку. На экране 4 будет видна дифракционная картина.
 - 1.2. Измерьте расстояние L между решеткой и экраном.
 - 1.3. Измерьте расстояние l_1 между максимумами первого порядка. Проведите аналогичные измерения расстояний l_n для максимумов второго и третьего порядков.
 - 1.4. Определите углы α_n по формуле (4).
 - 1.5. По формуле (5) вычислите длину волны излучения λ для каждого угла α_n .
 - 1.6. Вычислите среднюю длину волны излучения лазера $\langle \lambda \rangle$.
 - 1.7. Результаты измерений и вычислений занесите в таблицу 1:

Таблица 1

n	L, мм	l_n , мм	α_n , град	λ , мкм	$\langle \lambda \rangle$, мкм

2. Определение размеров эритроцитов.
 - 2.1. Приготовьте препарат эритроцитов в виде мазка на предметном стекле. Для этого нужно стеклянной палочкой нанести каплю крови на предметное стекло, и распределить ее той же палочкой по стеклу тонким слоем.
 - 2.2. Укрепите в держателе 3 препарат эритроцитов.
 - 2.3. Перемещая экран вдоль оптической скамьи, выберите такое расстояние L между препаратом и экраном 4, чтобы на последнем наблюдалась четкая дифракционная картина.
 - 2.4. Измерьте расстояние L между препаратом и экраном.
 - 2.5. Измерьте внутренний D_{min} и внешний D_{max} диаметры первого темного кольца. Прodelать такие же измерения для следующих светлых и темных колец.
 - 2.6. Вычислите по формуле (7) средние диаметры D_n для каждого кольца.

- 2.7. По формуле (6) определите углы дифракции α_n .
- 2.8. Пользуясь выражением (3), вычислите диаметр частиц d для каждого угла α_n .
- 2.9. Вычислите средний диаметр $\langle d \rangle$.
- 2.10. Результаты измерений и вычислений занесите в таблицу 2.

Таблица 2

n	p_n	L, мм	$D_{\min}$, мм	$D_{\max}$, мм	D_n , мм	α_n , град	d, мкм	$\langle d \rangle$, мкм

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ.

1. Что такое дифракция света?
2. Что представляет собой дифракционная решетка?
3. Как выглядит распределение интенсивности света после его прохождения через дифракционную решетку?
4. Как выглядит картина дифракции света на сфере?
5. Как с помощью дифракционной решетки измерить длину волны излучения?
6. Как определить размеры сферы?

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА.

6. Антонов В.Ф., Черныш А.М. и др. Биофизика.- М.: Владос, 2000.- 287 с.
7. Тиманюк В.А. Биофизика.- К.: Профессионал, 2004.- 704 с.
8. Ремизов А.Н. Медицинская и биологическая физика.- М.: Высшая школа, 1987.- 638 с.

Лабораторная работа №12

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ УЛЬТРАФИОЛЕТОВОГО ОБЛУЧЕНИЯ НА ПОВЕРХНОСТНОЕ НАТЯЖЕНИЕ ЛИПИДНЫХ ПЛЕНОК

Цель работы: исследовать влияние УФ-облучения на поверхностное натяжение липидных пленок.

Необходимое оборудование и принадлежности: торсионные весы ВТ-500, УФ лампа, кольцо, чашки Петри, стеклянная палочка; дистиллированная вода, глицерин, этанол, линетол.

Подготовка к работе.

Повторить следующие вопросы:

9. Понятие поверхностного натяжения. Сила поверхностного натяжения.
10. Понятие монослоя. Образование липидных монослоев. Силы межмолекулярного взаимодействия в монослое.
11. Действие ультрафиолетового излучения на липидные молекулы.

Поверхностное натяжение является важной характеристикой поверхности раздела фаз и поверхностных явлений. Оно характеризует избыток поверхностной энергии, приходящейся на единицу межфазной поверхности. Чем больше различия в силе межмолекулярных взаимодействий граничащих фаз, тем больше поверхностное натяжение. При температуре 20 °С поверхностное натяжение ртути составляет 485,0 мДж/м², воды – 72,8 мДж/м², этанола – 22,0 мДж/м², подсолнечного масла – 33,0 мДж/м², сливок – 42,0 мДж/м², вина – 45...55 мДж/м².

Наиболее доступными для экспериментального измерения поверхностного натяжения являются системы жидкость–газ и жидкость–жидкость. Определяющую роль в свойствах образующихся тонких жидких пленок (мономолекулярных слоев) играют **ван-дер-вальсовы взаимодействия**. Под **ван-дер-вальсовыми взаимодействиями** понимают взаимодействия, имеющие флуктуационное электромагнитное происхождение. Для этих взаимодействий во многих случаях характерна универсальная зависимость от расстояния. Так *энергия диполь-дипольного ван-дер-вальсова взаимодействия двух атомов обратно пропорциональна шестой степени расстояния, а для атомов и поверхности конденсированной среды - третьей*. При этом универсальность выражается в том, что специфика взаимодействующих частиц или тел, т.е. их конкретные свойства, сказывается лишь на значениях соответствующих коэффициентов, а не на виде функциональной зависимости энергии взаимодействия. Сильная зависимость ван-дер-вальсовых взаимодействий от расстояния обуславливает их **короткодействующий характер** и определяет радиус сферы молекулярного действия *от нескольких ангстрем до нескольких тысяч ангстрем*.

Возрастание потенциала ван-дер-вальсовых взаимодействий вблизи

поверхности конденсированной фазы, означает, что молекулы в поверхностном слое обладают дополнительной энергией по сравнению с молекулами внутри жидкости. Избыток свободной энергии ΔF , приходящийся на единицу площади поверхности раздела фаз ΔS , характеризуется **коэффициентом поверхностного натяжения σ** :

$$\sigma = \frac{\Delta F}{\Delta S} \quad (1)$$

Часто величину σ называют просто **поверхностным натяжением**. Величину σ измеряют в Дж/м², или Н/м, либо дин/см.

Свободную энергию образования границы раздела можно понимать как работу, которую необходимо затратить на перенос молекул жидкости из объема (субфазы) на поверхность раздела фаз. Силы, действующие в субфазе на определенную молекулу со стороны других молекул, скомпенсированы, тогда как на молекулу, расположенную на поверхности раздела, действуют силы притяжения только со стороны субфазы. Действием молекул, находящихся над поверхностью, можно пренебречь, так как плотность пара во много раз меньше плотности жидкости. Поэтому переход молекулы из глубины жидкости в поверхностный слой для увеличения поверхности связан с необходимостью совершения работы против действующих в поверхностном слое сил. Эта работа совершается молекулой за счет запаса ее кинетической энергии и идет на увеличение ее потенциальной энергии.

Коэффициент поверхностного натяжения жидкости уменьшается с ростом температуры, а при критической температуре он обращается в нуль (см. Примечание 1). Поверхностное натяжение раствора σ почти всегда отличается от поверхностного натяжения растворителя σ_0 , так как растворенные вещества в зависимости от их природы могут концентрироваться на поверхности раствора или переходить в объем раствора. Например, растворение солей приводит к увеличению коэффициента поверхностного натяжения (см. Примечание 2). Вещества, которые уменьшают поверхностное натяжение, адсорбируясь на поверхности раздела фаз, называются **поверхностно-активными (ПАВ)**. ПАВ относительно воды являются спирты, органические кислоты, амины и др. Поверхностно-активными веществами имеют способность адсорбироваться на поверхности воды, образуя при этом монослой. Такое свойство ПАВ обусловлено особенностями их структуры: молекулы наряду с полярными гидрофильными группами содержат неполярные углеводородные радикалы. На поверхности воды полярные группы взаимодействуют с молекулами воды, а гидрофобные концы выступают в воздушное пространство. Благодаря такому строению мономолекулярного слоя коэффициент поверхностного натяжения воды уменьшается.

Исследование **монослоев** дает информацию о таких физических параметрах индивидуальных веществ, как поверхностное давление монослоя ($\Delta\sigma = \sigma_0 - \sigma$, где σ_0 , σ - поверхностное натяжение для чистой воды и

после адсорбции ПАВ на границе раздела, соответственно), молекулярная площадь вещества в монослое, зависимость поверхностного давления от молекулярной площади. Для оценки величины поверхностного натяжения наиболее часто используют статические или полустатические методы, позволяющие измерять равновесные значения поверхностного натяжения жидкостей. К статическим относятся методы капиллярного поднятия жидкости и висячей (лежащей) капли. Полустатическими являются методы максимального давления в капле (пузырьке), отрыва кольца или пластины и сталагмометрический метод. Наиболее часто для определения поверхностного натяжения применяют следующие методы: наибольшего давления, сталагмометрический, отрыва кольца и уравнивания

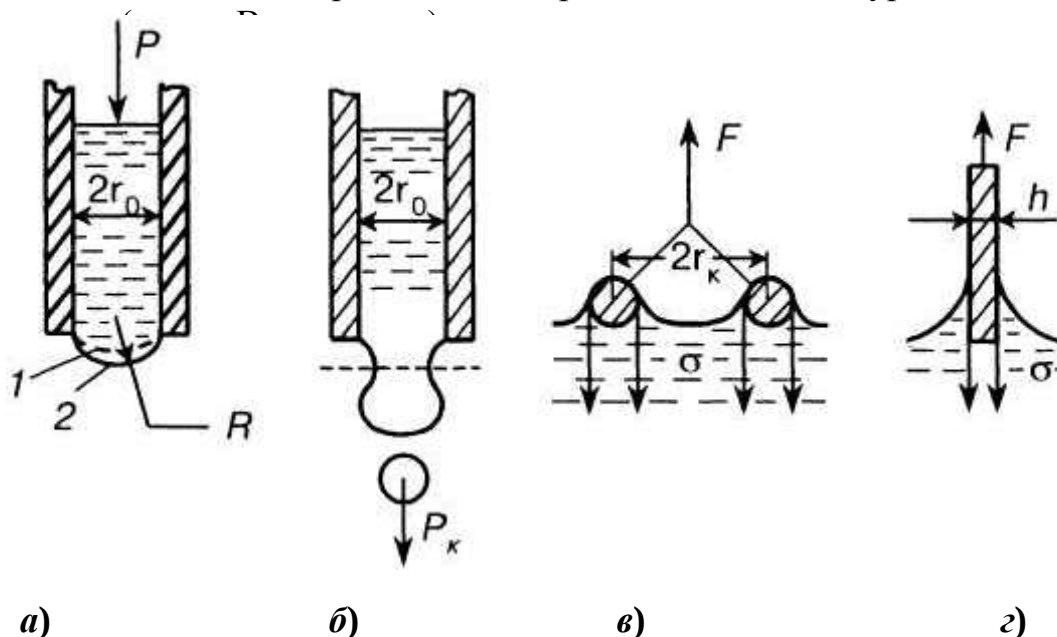


Рис. 1. Методы определения поверхностного натяжения:

a – наибольшего давления; $б$ – сталагмометрический; $в$ – отрыва кольца;
 $г$ – уравнивания пластины

Метод наибольшего давления основан на продавливании пузырька газа или воздуха под воздействием внешнего давления p через калиброванный капилляр радиусом r_0 (рис. 1.1, a). С увеличением давления пузырек растет, а радиус кривизны его поверхности R превышает радиус капилляра (положение 1 : $R > r_0$). Дальнейшее увеличение объема пузырька будет происходить до тех пор, пока внутреннее давление достигнет своего максимального значения; радиус кривизны при этом будет минимальным, т.е. $R = r_0$ (положение 2).

В этот момент пузырек теряет устойчивость: при увеличении его объема он отрывается от капилляра. Если в момент отрыва пузырька измерить давление p , то поверхностное натяжение можно выразить следующим образом:

$$p = \frac{2\sigma}{r_0} \rightarrow \sigma = \frac{pr_0}{2} \quad (2)$$

Для того чтобы не измерять радиус капилляра, можно определить p эталонной жидкости, поверхностное натяжение которой известно, например воды. Тогда вместо формулы (2) можно записать

$$\sigma = \sigma_{H_2O} \frac{p}{p_{H_2O}} \quad (3)$$

В **сталагмометрическом методе** определяют вес капли, которая отрывается от капилляра (см. рис 1.1, б) под действием силы тяжести или в результате выдавливания микрошприцом. Приблизительно считают, что при отрыве вес капли P_k уравнивается силой, равной поверхностному натяжению, умноженному на длину окружности капилляра радиусом r_0 т.е.

$$P = 2\pi \frac{r_0 \sigma}{k} \rightarrow \sigma = \frac{Pk}{2\pi r_0} \quad (4)$$

$$\sigma = km \quad (5)$$

где k – постоянная сталагмометра; m – масса одной капли.

При измерении поверхностного натяжения методом наибольшего давления и сталагмометрическим методом пузырек и капля формируются сравнительно быстро за время, недостаточное для образования адсорбционного слоя растворенных молекул ПАВ, особенно, если они имеют сравнительно большую молекулярную массу. В этих условиях не успевает установиться равновесное поверхностное натяжение. Для подобных растворов рекомендуется увеличивать время формирования пузырька или капли до тех пор, пока давление или число капель станут постоянными.

В **методе уравнивания пластинки** (или методе Вильгельми) определяют силу F , необходимую для извлечения из жидкости, погруженной в нее тонкой пластинки шириной h (см. рис. 1.1, г):

$$F = 2\sigma h \quad (6)$$

Метод отрыва кольца основан на том, что поверхностное натяжение можно определить как *силу, действующую на единицу длины контура поверхности раздела фаз и стремящуюся сократить эту поверхность до минимума*. Направлена сила поверхностного натяжения по касательной к поверхности жидкости, перпендикулярно к участку контура, на который она действует.

Величину поверхностного натяжения экспериментально можно определить по силе отрыва кольца, образующего контур по формуле:

$$\sigma = \frac{P - P_0}{2\pi r} \quad (7)$$

где P - вес кольца, [Н], измеренный в момент отрыва;

P_0 - абсолютный вес кольца [Н];

r - наружный радиус кольца, [м].

Поскольку весы отградуированы в единицах массы, поэтому формулу (7) удобно привести к виду:

$$\sigma = \frac{g(m - m_0)}{2\pi} \quad (7a)$$

где **g**- ускорение свободного падения, равное **9,81 м/с²**;

m и **m₀**- показание весов в момент отрыва и абсолютная масса, соответственно, [кг].

Измерение поверхностного натяжения жидкостей методом отрыва кольца производится при помощи торсионных весов. Для этого, легкое металлическое кольцо, подвешенное к торсионным весам, приводится в соприкосновение с поверхностью исследуемой жидкости. Затем увеличивают силу натяжения подвески, медленно поворачивая рычаг натяжения, и фиксируют показания весов в момент отрыва кольца. Значение силы в момент отрыва кольца. Значение силы в момент отрыва кольца отражает значение поверхностного натяжения.

Х о д р а б о т ы:

Задание 1. Определение поверхностного натяжения воды.

1. Подготовить торсионные весы для проведения измерений. Для этого весы устанавливают при помощи опорных винтов так, чтобы пузырек уровня был отцентрирован. Тщательно очищенное металлическое кольцо подвешивают за дужку на крючок коромысла торсионных весов. Чистую чашку заполняют дистиллированной водой и устанавливают ее на подъемном столике.
2. При помощи подъемного механизма поднять чашку до тех пор, пока поверхность жидкости не соприкоснется с кольцом. При этом не следует допускать утапливания кольца. Указатель веса установить в начало шкалы, передвинуть закрепительный рычаг - ***арретир*** - в положение *свободно* и начать медленно поворачивать рычаг натяжения против часовой стрелки. В течение этой операции необходимо постоянно следить за положением кольца и останавливать движение точно в момент отрыва кольца от поверхности жидкости. Записать показание весов. (В том случае, если величина силы отрыва кольца выходит за предел шкалы весов, то с помощью тарировочного винта, расположенного на задней стенке корпуса весов, можно сместить начало отсчета и тем самым получить возможность произвести изменения. При дальнейших измерениях положение тарировочного винта изменять уже нельзя).
3. Слегка опустить подъемный столик и произвести взвешивание кольца для определения значения **m₀**. Для получения данных во время взвешивания необходимо передвигать рычаг натяжения только против часовой стрелки и не очень быстро, стараясь не допускать отклонения стрелки показателя равновесия (в нижней части циферблата) вправо от

черты равновесия. Указатель массы возвращается к нулю поворотом рычага натяжения по часовой стрелке при закреплённом арретире.

4. Прodelать 3-4 измерения (пп.2и3), найти среднее значение и оценить среднюю квадратичную погрешность m и m_0 (см. Приложение. Элементы теории погрешностей). Рассчитать $\bar{\sigma}$ и, приняв фиксированное значение для ошибки Δr , оценить $\Delta \sigma$. Сравнить $\bar{\sigma}$ с табличным значением σ для воды при данной температуре.

Задание 2. Проведение градуировки торсионных весов.

Определение поверхностного натяжения различных жидкостей проводят также по измерению силы отрыва кольца от поверхности исследуемой жидкости. Однако из-за различной смачиваемости и отклонения от идеальной геометрии кольца применение формулы (7 или 7а) для расчета σ ограничено. Поэтому при получении значения σ более удобно воспользоваться **градуировкой торсионных весов**. Для получения градуировки необходимо измерить силу отрыва кольца от поверхности эталонных жидкостей и построить график зависимости табличных значений поверхностного натяжения эталонных жидкостей от полученных показаний торсионных весов. Считая, что такая зависимость должна иметь линейный характер, значения поверхностного натяжения σ_x неизвестной жидкости выражается как

$$\sigma_x = \sigma_1 + \frac{\sigma_2 - \sigma_1}{P_2 - P_1} \cdot P_x - P_1 \quad (8)$$

или

$$\sigma_x = \sigma_1 + \frac{\sigma_2 - \sigma_1}{m_2 - m_1} \cdot m_x - m_1 \quad (8a)$$

где σ_1 и σ_2 – табличные значения поверхностного натяжения эталонных жидкостей (например, воды и этанола);

P_1, P_2, P_x и m_1, m_2, m_x – сила отрыва кольца или значение показаний весов в момент отрыва для двух эталонных и исследуемой жидкостей, соответственно.

При проведении градуировки торсионных весов измерить 3-4 раза силу отрыва кольца для предлагаемых эталонных жидкостей, получить средние значения и по средним значениям построить градуировочную зависимость на графике.

Задание 3. Изучение влияния различных режимов УФ-облучения на поверхностное натяжение линетоловых пленок.

1. Сформировать 3 образца линетоловых пленок на поверхности воды. Для этого стеклянной палочкой, смоченной в линетоле, слегка касаются поверхности воды. В процессе растекания изменяется цвет пленки, приобретая радужные тона. Это свидетельствует о том, что толщина пленки соизмерима с соответствующей длиной волны света.

Формирование пленки можно считать законченным, когда растекание прекращается, а вся поверхность пленки окрашивается в однотонный серый цвет. Процесс может продолжаться около **10-15 мин.** Следует отметить, что при большом количестве липида, перенесенного на поверхность воды, он не растекается по поверхности, а остается в виде капельки.

2. Измерить поверхностное натяжение для полученных образцов пленок и определить среднее значение. При большом разбросе значений следует произвести повторное формирование пленок и измерение поверхностного натяжения. После каждого измерения ополоснуть кольцо в растворителе №1 и аккуратно промокнуть фильтровальной бумагой для удаления остатков растворителя. Затем сполоснуть его в растворителе №2 и опять промокнуть фильтровальной бумагой.
3. Для изучения действия УФ облучения, провести следующие эксперименты:
 - а) сформировать на воде 2 липидные пленки, облучить их в течение **5 и 15 минут** и измерить поверхностное натяжение образцов пленок;
 - б) поместить на 2 предметных стекла по капле линетола и облучить в течение **5 и 15 минут**, сформировать из них на поверхности воды пленки и измерить их поверхностное натяжение;
 - в) результаты экспериментов занести в таблицу:

Время облуч. (мин.)	Пленка линетола на воде.	Линетол в капле.
0		---
5		
15		

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ:

1. Описать структуру моно- или мультимолекулярных пленок на основе линетола.
2. Как изменяется поверхностное натяжение при образовании молекулярных структур на поверхности воды?
3. Какова причина возникновения избыточной поверхностной энергии?
4. Что называется поверхностным натяжением? В каких единицах оно измеряется?
5. От чего зависит величина поверхностного натяжения?
6. Какие вещества называют поверхностно-активными? Приведите примеры ПАВ.
7. Характеристика липидного монослоя.
8. Какие методы измерения поверхностного натяжения Вы знаете?

9. Основные положения метода "отрыва кольца".

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА:

1. Ремизов А.Н. Медицинская и биологическая физика. — М., Высшая школа, 1996.
2. А.Б.Рубин. Современные методы биофизических исследований. М., Высшая школа, 1988.

Примечание 1.

Поверхностное натяжение уменьшается при возрастании температуры. Для многих жидкостей выполняется следующая эмпирическая формула:

$$-\frac{d}{dT} = \left[\sigma \left(\frac{M}{\rho} \right)^{\frac{2}{3}} \right] = 2,12$$

где **M** - молекулярный вес; **ρ** - плотность; **T** - температура.

Поверхностное натяжение для раздела фаз жидкость-воздух:			
T, °C	σ, дин/см		
	вода	спирт этил.	ацетон
0	75,7	24,1	--
10	74,2	23,6	--
15	73,5	--	--
20	72,75	22,8	23,7
25	72,0	--	--
30	71,2	21,9	--
40	69,6	--	--
50	67,9	--	20,0
60	6,2	--	--
70	64,4	--	--
80	62,8	--	--
100	58,8	--	--

вещество	σ, дин/см
глицерин	63,4
фенол	40,9
анилин	42,9
кислоты:	
уксусная	27,8
масляная	26,8
олеиновая	32,5

Примечание 2.

Поверхностное натяжение водных растворов солей концентрации M подчиняется следующей зависимости:

$$\sigma = \sigma_{H_2O} + M\Delta\sigma$$

$\Delta\sigma$ - изменение σ для раствора, концентрация которого равна 1г-экв/л

соль	$\Delta\sigma$ при 20 ⁰ C
KCl	1,4
NaCl	1,64