

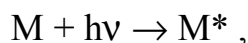
**ИЗУЧЕНИЕ ФОТОДИНАМИЧЕСКОГО ГЕМОЛИЗА ЭРИТРОЦИТОВ**

**Фотобиология** изучает закономерности и механизмы действия света на биологические системы. Фотобиологические процессы протекают под действием излучения в ультрафиолетовой, видимой и близкой инфракрасной области спектра. Под **фотобиологическими реакциями** следует понимать химические или физические изменения в биологических системах, вызванные этими излучениями.

*Фотобиологический процесс представляет собой последовательность различных стадий, начинающихся с момента поглощения кванта световой энергии и заканчивающихся разнообразными биохимическими и физиологическими эффектами.* Изучение процессов, происходящих на этих стадиях, требует выбора соответствующих методов исследования. Основные стадии фотобиологического процесса с указанием некоторых из этих методов представлены на схеме:

Последовательные стадии фотобиологического процесса				Методы исследования
Поглощение кванта энергии				Исследование спектров поглощения и спектров действия
миграция энергии	переход в триплетное состояние	люминесценция	растрата в тепло	Изучение люминесценции
Первичный фотохимический акт  Стабилизация продуктов				Исследование кинетики фотохимических процессов при низкой температуре, дифференциальная и импульсная спектрофотометрия, ЭПР, исследование фотоэлектрических явлений, измерение сверхслабых свечений.
Биохимические процессы				Биохимические исследования
Физиологическое действие				Изучение физиологических процессов

Физическая реакция поглощения света молекулой, являющаяся первым этапом фотобиологического процесса, может быть записана в следующем виде:



где **M** и **M\*** - основное и возбужденное состояния молекулы, соответственно.

Возбужденная молекула не отличается по химическому составу и строению от молекулы в основном состоянии  $E_0$ , но имеет несколько деформированное электронное облако и обладает большей энергией  $E^*$  на величину энергии поглощенного кванта света, т.е.

$$E^* - E_0 = h\nu$$

*Фотохимические превращения претерпевают молекулы не в основном, а в возбужденном состоянии, к которому приводит поглощение кванта света (правило Гротгуса). Важнейшей количественной характеристикой фотохимической реакции является **квантовый выход реакции**, представляющий собой отношение числа прореагировавших молекул данного вещества к числу молекул, поглотивших фотоны. Количество образовавшихся фотопродуктов определяется **дозой** - произведением интенсивности падающего света  $I$  на время облучения  $t$ . Иными словами, для необратимой одноквантовой фотохимической реакции одинаковые произведения  $I \cdot t$  создают одинаковые количества фотопродуктов, независимо от численных значений, которые принимают  $I$  и  $t$  в отдельности - правило Бунзена-Роско.*

Поскольку свет имеет фотонную природу, *первичным изменением после каждого поглощения кванта света является только одно физическое или химическое превращение молекулы - закон эквивалентности Эйнштейна-Штарка. Однако в случае цепных реакций первичный фотопродукт может генерировать большое количество вторичных продуктов и кажущийся квантовый выход реакций будет больше единицы. С другой стороны, известны и такие реакции, когда для образования конечного продукта необходимо последовательное поглощение двух квантов света.*

Для фотобиологии в основном типичны одноквантовые фотохимические реакции. Известны следующие основные типы одноквантовых фотохимических реакций органических молекул:

1. *Фотораспад*, при котором с разрывом химических связей происходит распад молекулы на радикалы, ионы или нейтральные молекулы.
2. *Фотоперегруппировки*, в ходе которых один изомер или таутомер превращается в другой.
3. *Фотоприсоединение*, при котором происходит присоединение к возбужденной молекуле других молекул.
4. *Фотоперенос электронов*, при котором возбужденная молекула отдает свой электрон второй, невозбужденной молекуле, или, наоборот, получает лишний электрон.
5. *Фотоперенос протона*; суть этой реакции - в присоединении к возбужденной молекуле протона от невозбужденной кислоты или, наоборот, - в отдаче возбужденной кислотой своего протона основанию.

На такие объекты, как клетки и ткани животных, видимый свет обычно не оказывает заметного эффекта. Однако, в присутствии некоторых красителей воздействие света, в особенности, ультрафиолетового диапазона приводит к повреждению или гибели клеток. Это явление носит название **фотодинамического действия**. Какие молекулярные структуры клетки в этом случае повреждаются в первую очередь, определяется, с одной стороны, природой красителя, с другой - особенностями биологического объекта, а именно проницаемостью клеток для красителя и его распределением внутри клетки.

Цепь событий, приводящих к биологическому эффекту, начинается с образования возбужденного состояния молекулы красителя в результате поглощения кванта света. Эта стадия запускает фотохимические превращения, представляющие в основном окисление биологически важных веществ. При этом наиболее эффективно будут разрушаться молекулы тех веществ, с которыми краситель из-за повышенного сродства либо образует комплекс, либо находится в непосредственной близости.

**Цель работы:** исследовать явление фотодинамического гемолиза эритроцитов.

**Необходимое оборудование, принадлежности и материалы:**

- фотоэлектрический колориметр КФК, осветитель, мерные цилиндры, пипетки, колбы, пробирки, сосуд с 0,5% раствором  $\text{CuSO}_4$ ;
- физиологический раствор, раствор гепарина, 0,04% раствор эритрозина, 0,1М раствор гипосульфита, дистиллированная вода.

### **Ход работы:**

**Задание 1. Изучение гемолиза методом фотоколориметрии.**

При разрушении эритроцитов - гемолизе - происходит уменьшение мутности суспензии, а следовательно, - увеличение светопропускания: образец становится более прозрачным. Изменение пропускания суспензии эритроцитов поэтому может служить мерой гемолиза. Пропускание эритроцитов можно измерять на фотоэлектрокалориметре /ФЭК/. Чтобы поглощение гемоглобина не мешало измерению светорассеяния, определение гемолиза производят с красным светофильтром, т.е. в спектральной области, где гемоглобин не поглощает, и все изменения светопропускания связаны исключительно с изменением мутности раствора - светорассеянием.

1. Подготовить прибор к работе (приложение 1):

установить красный светофильтр (670нм);

в кюветное отделение установить кювету ( $d=5\text{мм}$ ) с дистиллированной водой и регулировкой чувствительности добиться показания прибора 100% по шкале Т.

2. Приготовить 1% взвесь отмытых эритроцитов в физиологическом растворе. Две пробы исходной суспензии развести в 4 раза: одну - дистиллированной водой, другую - физиологическим раствором.

3. Измерить пропускание 1-го раствора в течение 1 минуты. Пропускание 2-го раствора измерять в течение часа через каждые 15 минут. В качестве образца сравнения, относительно которых производится измерение светопропускания для обоих образцов, служит кювета с дистиллированной водой. Убедиться в том, что пропускание образца, в который добавлена вода (гипотонический гемолиз) значительно превышает пропускание суспензии эритроцитов в физиологическом растворе (контроль).

**Задание 2. Исследование гемолиза эритроцитов под действием освещения в присутствии красителя.**

В качестве источника для облучения суспензии эритроцитов используют мощную лампу накаливания. Пробирки с облучаемой суспензией помещают на расстоянии **25 см** от источника освещения. Чтобы исключить нагревание объекта инфракрасным излучением лампы, между ней и пробирками с суспензией эритроцитов помещают стеклянный сосуд, заполненный **0,5%** раствором  $\text{CuSO}_4$  (толщина слоя раствора должна быть около **5-10 см**).

**1.** Приготовить **0,04%** раствор эритрозина на физиологическом растворе. В две пробирки налить по **4 мл** раствора эритрозина и добавить в каждую пробирку **1 мл 1%** суспензии эритроцитов /проба 1 и проба 2/.

**2.** Налить в две контрольные пробирки по **4 мл** физиологического раствора и по **1 мл** взвеси эритроцитов /проба 3 и проба 4/.

**3.** Тщательно перемешать растворы во всех пробирках.

**4.** Пробы 1 и 3 облучить в течение **10 минут**. Пробы 2 и 4, которые служат темновым контролем, в это время должны находиться в темноте при той же (комнатной) температуре.

**5.** Поместить все пробирки в темноту и их пропускание измерять через каждые **15 минут** в течение **1 часа**. Измерения производятся так, как в задании 1. В качестве раствора сравнения использовать **0,04%** раствор эритрозина на физиологическом растворе.

Результаты измерений представить в виде графика зависимости пропускания **T** от времени после облучения **t** для всех четырех проб:

*эритроциты + краситель + освещение;*

*эритроциты + краситель, без освещения;*

*эритроциты + освещение, без красителя;*

*эритроциты, без красителя и без освещения.*

### **З а д а н и е 3. Влияние антиокислителей на фотодинамический гемолиз.**

Поскольку в ряде случаев в основе фотодинамического действия лежит реакция фотоокисления белков за счет световой энергии, поглощенной красителем, скорость и степень фотодинамического гемолиза можно уменьшить, добавляя к взвеси эритроцитов вещества антиокислительного характера. В качестве одного из них можно использовать гипосульфит  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ .

**1.** Приготовить четыре пробирки, содержащие по **4 мл 0,004%** раствора эритрозина, приготовленном на физиологическом растворе + **1 мл 1%** взвеси эритроцитов.

**2.** В две пробирки /пробы 1 и 2/ добавить по **0,5 мл 0,11 М** раствора гипосульфита (раствор этой концентрации изотоничен физиологическому раствору и поэтому не вызовет гемолиза).

**3.** В две другие пробирки /пробы 3 и 4/ добавить по **0,5 мл** физиологического раствора, чтобы концентрация суспензии эритроцитов в опыте и в контроле была одинаковой.

**4.** Пробы 1 и 3 облучить, как в предыдущем задании. Пробы 2 и 4 держать в темноте.

**5.** Сразу после облучения и затем через каждые **15 мин** измерять светопропускание этих проб в течение **1 часа**.

Результаты измерений представить в виде графика зависимости пропускания **T** от времени, прошедшего после облучения, для всех четырех проб:

*эритроциты + краситель +  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  + освещение;*

эритроциты + краситель +  $Na_2S_2O_3$ , без освещения;  
эритроциты + краситель + освещение;  
эритроциты + краситель, без освещения.

#### КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ:

1. Что такое квантовый выход фотохимических реакций?
2. Типы фотохимических реакций.
3. Что такое фотодинамическое действие?

#### ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА:

1. Конев С.В., Волотовский И.Д. Фотобиология, Минск, Высш.шк., 1974.

#### Лабораторная работа № 2.

### МЕТОД КИСЛОТНЫХ ЭРИТРОГРАММ. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ЭРИТРОЦИТОВ ПО СТОЙКОСТИ.

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.

**Цель работы** : освоить метод кислотных эритрограмм.

**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).

### Ход работы:

**Задание 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  $\Delta V$  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 (10с) 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.

**Задание 2. Построить дифференциальную и интегральную эритрограммы для контрольного образца.**

Для построения эритрограмм необходимо заполнить следующую таблицу:

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

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  $\Delta D_i$  :

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

где  $\Delta D$  - 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:

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

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:

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

где  $t_{\text{м}}^{\text{к}}$  и  $t_{\text{м}}$  - время гемолиза основной группы стойкости соответственно для контрольного и изучаемого образца (время, соответствующее максимальному значению  $\Delta D_i$  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  $\Delta t$ . Преимущество непосредственного способа записи заключается в том, что он позволяет избежать разброса значений  $\Delta D_i$ , вызванного неодинаковыми интервалами времени при регистрации  $D_i$  в процессе гемолиза. Для каждого измерения независимо от текущего времени этот интервал будет постоянным и равен  $\Delta t$ ; таким образом, соблюдается требование равенства интервалов времени регистрации. Время  $\Delta t$  будет соответствовать интервалам регистрации показаний ФЭКа при обычной записи динамики гемолиза. Интервалы регистрации можно изменять, варьируя разность времени приготовления образцов. Выбору оптимального значения  $\Delta t$  соответствует интервал времени равный разности между моментом, когда скорость гемолиза наибольшая (время  $t_m$ , соответствующее максимальному значению  $\Delta D_i$  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  $\Delta t$  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  $\Delta t$  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 Т. 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 Т. 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 окончанию гемолиза заменить кювету № 1 кюветой с физраствором. Выставить для последней **100%** по шкале Т 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  $\% \Delta D$  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.

#### Лабораторная работа № 3

### ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОНИЦАЕМОСТИ ЭРИТРОЦИТОВ ДЛЯ ИОНОВ КАЛИЯ МЕТОДОМ ПЛАМЕННОЙ ФОТОМЕТРИИ.

Пламенная фотометрия относится к методам эмиссионной спектроскопии. Метод пламенной спектроскопии основан на возбуждении термической энергией высокотемпературного пламени атомов многих элементов. Возбуждаемые в пламени атомы испускают излучение в видимой области спектра, которое может быть зарегистрировано фотоэлементами чувствительными к этой области спектра.

Частота излучаемого света равна разности энергий возбужденного и основного состояний атома:

$$h\nu = E^* - E_0,$$

где  $E^*$  - энергия атома в возбужденном состоянии,

$E_0$  - энергия атома в основном состоянии,

$h$  - постоянная Планка,

$\nu$  - частота излучения.

Термически возбужденные атомы химических элементов дают излучение определенной длины волны. **Длина волны** является, таким образом, *характерным качественным фактором, по которому можно определить наличие того или иного элемента.*

В то же время **интенсивность излучения** является *количественной характеристикой* процесса, поскольку интенсивность излучения растет с увеличением числа возбуждаемых в пламени атомов, и так как анализируемые образцы обычно вводят с постоянной скоростью, то **интенсивность излучения**, в конечном итоге, будет зависеть от *концентрации вещества, в котором присутствуют атомы данного элемента.* Экспериментальные результаты, представленные в виде графика зависимости показаний прибора от концентрации,

дают стандартную калибровочную кривую, по которой простой интерполяцией легко можно вычислить концентрацию анализируемого раствора.

Метод пламенной фотометрии позволяет определять целый ряд элементов (см. Табл.). Область применения метода ограничена как количеством определяемых элементов, так и тем обстоятельством, что с его помощью можно анализировать только растворы. Однако в тех случаях, когда возможно применение этого метода, он обладает существенными преимуществами: *высокой чувствительностью* (см. Табл.); *большой быстротой проведения измерения* (продолжительность одного замера ~ 30 с); *относительно малым количеством образца, необходимого для проведения анализа* (3÷5 мл).

Таблица

Элемент	Длина волны, А	Максимальная чувствительность определения, %
Калий	7665, 4044	$5 \cdot 10^{-6}$
Натрий	5890	$1 \cdot 10^{-6}$
Литий	6740	$6 \cdot 10^{-6}$
Кальций	4227	$3 \cdot 10^{-4}$
Магний	2852	$1 \cdot 10^{-4}$
Железо	3737	$1 \cdot 10^{-2}$
Медь	3275	$1 \cdot 10^{-3}$

#### Описание прибора.

Прибор состоит из трех основных систем: **системы возбуждения, оптической системы и регистрирующей системы** (см. рис.).

*Система возбуждения* состоит из горелки 1, распылительной камеры 2, компрессора 3, регулятора давления и манометра 4. Через патрубок 5 смесь горючих газов поступает в горелку, в пламени которой происходит термическое возбуждение и испускание атомов. Компрессор служит для нагнетания избыточного давления в распылительной камере. Необходимое давление устанавливается при помощи регулятора и контролируется по манометру. Исследуемый раствор образца из стаканчика 6 поступает в распылительную камеру, где образуется аэрозоль, поступающий далее в пламя горелки.

*Оптическая система* служит для коллимирования и выделения монохроматического пучка света. В эту систему входят оптические фильтры 7,

## Рис. Схема пламенного фотометра:

избирательно пропускающие свет для различных длин волн и другие оптические устройства, предназначенные для коллимирования светового пучка: диафрагма 8, линза 9, щель 10.

*Регистрирующая система* объединяет устройство, преобразующее световую энергию в электрический сигнал - фотоэлемент 11, электронную схему усиления 12 и электрический прибор для регистрации электрического сигнала 13.

**Цель работы** : исследовать методом пламенной фотометрии проницаемость эритроцитов для ионов калия.

### **Необходимое оборудование, принадлежности и материалы:**

- пламенный фотометр, центрифуга, стаканчик для измерений, стеклянная палочка;
- 1,48% раствор NaCl, растворы KCl (приготовленные на фиксанале) концентрации 100 мг/л, 50 мг/л, 25 мг/л, 12 мг/л, 6 мг/л, 3 мг/л и 1,5 мг/л, дистиллированная вода, эритроциты.

### **Ход работы:**

#### **Задание 1. Построение градуировочной кривой.**

Градуировочная кривая строится по растворам хлорида калия, которые готовятся основе эталонного раствора. Построение градуировочной кривой начинают с фотометрирования дистиллированной воды.

**1.** Рукояткой *компенсация* световой указатель микроамперметра установить на нуль. Необходимо иметь два "нулевых" раствора: один для промывки капилляра при переходе от одной концентрации к другой, а второй для проверки нуля шкалы.

**2.** После фотометрирования "нулевой" пробы провести фотометрирование эталонного раствора наибольшей концентрации. При фотометрировании раствора наибольшей концентрации рукояткой прибора *чувствительность* следует выставить световой указатель на деление **50** шкалы микроамперметра. После этого снова профотометрировать хорошо очищенную воду и рукояткой *компенсация* выставить световой указатель на "нуль", если он самопроизвольно не вернется в первоначальное положение через **3-4 мин.**

**3.** Взять эталонные растворы элемента с равномерно возрастающей концентрацией и поочередно ввести их через распылитель в пламя фотометра. Для каждой концентрации раствора будет наблюдаться соответствующее показание в виде светового пятна на шкале микроамперметра. Ввиду некоторой инерционности прибора отсчет снимается через **20÷30 с** после начала распыления фотометрируемого раствора, т.е. когда световой указатель займет устойчивое положение.

**4.** По полученным данным построить градуировочную кривую в виде зависимости концентрации раствора от показания прибора.

Давление воздуха и газа, положение рукоятки *компенсация* и *чувствительность* должны быть неизменными в процессе проведения градуировки и последующего эксперимента.

**З а д а н и е 2. Изучение проницаемости мембраны эритроцитов для ионов калия.**

1. Профотометрировать **1,48%** раствор **NaCl** и убедиться в отсутствии в нем ионов калия.
2. Отцентрифугировать цельную кровь в течение **15 минут** при **1000 об/мин** и удалить сыворотку.
3. Приготовить суспензию эритроцитов, добавив в осажденную эритромассу **5 мл 1,48%** раствора **NaCl** и осторожно помешивая стеклянной палочкой. Отметить момент времени приготовления суспензии.
4. Отцентрифугировать приготовленную суспензию.
5. Слить надосадочную жидкость в стаканчик для измерений и провести фотометрирование, регистрируя появление в ней ионов калия, вышедшего из эритроцитов. Отметить время с момента приготовления суспензии.
6. В центрифужную пробирку с эритроцитами слить жидкость из стаканчика для измерений и приготовить суспензию, осторожно помешивая стеклянной палочкой.
7. Через **5 мин.** вторично отцентрифугировать суспензию и провести аналогичное п.5 фотометрирование надосадочной жидкости. После фотометрирования также как в п.6 приготовить суспензию.
8. Повторить опыт как указано в п.7 через **15** и **30 мин.**
9. Пользуясь градуировочной зависимостью, определить количество ионов калия, вышедших из эритроцитов в раствор **NaCl** в разные моменты времени. Построить кривую временной зависимости выхода ионов калия из эритроцитов.

**КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ:**

1. Каково распределение ионов калия и натрия между клеткой и средой и чем такое распределение обусловлено?
2. Методы определения ионов калия и натрия, их чувствительности.
3. Принцип метода пламенной фотометрии, его достоинства и недостатки.

**ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА:**

1. Ксандопуло Г.И., Щербов Л.Н. Фотометрия пламени, Алма-Ата, Высш.шк., 1958.
2. Лебедев В.И. Определение щелочных и щелочноземельных элементов в силикатных породах методом спектрофотометрии пламени, *Ж-л. анал. хим.*, 1959, т.14, N3, 283,.
3. Полуэктов Н.С., Никонова М.П. Теоретические основы метода спектрофотометрии пламени и применение его в цветной металлургии. Спектральный анализ в цветной металлургии. М., 1960.
4. Бурриель-Марти Ф. Фотометрия пламени. М., Высш.шк., 1962.

**ИЗУЧЕНИЕ ЯВЛЕНИЯ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА ДРОЖЖЕВЫХ КЛЕТОК**

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** ( $\xi$ /дзета-потенциал).

При таком подходе в определении  $\xi$ -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];

$\sigma$ - поверхностная плотность заряда, [Кл/м<sup>2</sup>];

$\epsilon$ - диэлектрическая проницаемость;

$\epsilon_0$ - электрическая постоянная, равная  $8,85 \cdot 10^{-2}$  Ф/м.

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

Рис.1

Рассмотрим систему сил, прикладываемых к элементу поверхности  $\delta S$  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  $f_{вн.тр.}$ - сила сопротивления перемещению соприкасающихся слоев жидкости относительно друг друга, обусловленная действием межмолекулярных сил сцепления. Величина этой силы пропорциональна градиенту скорости относительного перемещения в направлении  $r$  перпендикулярном направлению скорости  $\vec{u}$  (рис.1):

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

где:  $\eta$ - коэффициент вязкого трения или вязкость.

В условиях равномерного движения должен соблюдаться баланс сил  $f_{эл} = -f_{вн.тр.}$ , 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  $\left| \frac{d\vec{u}}{dr} \right| = \frac{u}{d}$ . С учетом этого из (2)

можно выразить  $\sigma$  :

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

Подставив выражение (3) для  $\sigma$  в формулу (1) для  $\xi$ -потенциала получаем формулу Смолуховского:

$$\xi = \frac{\eta}{\epsilon \epsilon_0} \cdot \frac{u}{E} \quad (4)$$

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

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

С учетом этих значений формула (4) примет вид:

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

Т.о. определение  $\xi$ -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:

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

Т.к.  $1\Phi = \frac{1Kl}{1B}$ , а  $1H = \frac{1B \cdot Kl}{m}$  то размерность коэффициента выражается как  $\left[ \frac{B^2 \cdot c}{m^2} \right]$ . При подстановке всех значений в формулу (4б) в указанных размерностях величина  $\xi$ -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. 1- камера с крышкой; 2- агаровые сифоны; 3- соединительные трубки; 4- стаканчики с раствором KCl; 5- стаканчики с раствором CuSO<sub>4</sub>; 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 CuSO<sub>4</sub> с медными электродами, которые при помощи металлических проводников соединены с выходными клеммами коммутатора.

Рис.3. 1- источник постоянного тока; 2 - потенциометр; 3 - вольтметр; 4 - миллиамперметр; 5 - выключатель; 6 - коммутатор; 7- камера; 8 - неполяризующиеся электроды.

**Цель работы :** Изучить явление электрофореза для биологического объекта.

**Необходимое оборудование, принадлежности и материалы:**

- микроскоп, окуляр-микрометр, объект-микрометр, электрофоретическая установка, секундомер;
- насыщенный раствор CuSO<sub>4</sub>, 10% раствор KCl, раствор сахарозы, 0,1 М раствор лимонной кислоты, 0,2 М раствор Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, дрожжи.

**Ход работы:**

**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 mA**. 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  $\zeta$  -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  $\zeta$  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  $\zeta$ -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  $\zeta$ -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 <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , мл	лим.к-та, мл	pH	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , мл	лим. к-та, мл
<b>2,2</b>	0.2	9.8	<b>5,2</b>	5.36	4.64
<b>2,4</b>	0.62	9.38	<b>5,4</b>	5.58	4.42
<b>2,6</b>	1.09	8.91	<b>5,6</b>	5.80	4.20
<b>2,8</b>	1.58	8.42	<b>5,8</b>	6.05	3.95
<b>3,0</b>	2.05	7.95	<b>6,0</b>	6.31	3.69
<b>3,2</b>	2.47	7.53	<b>6,2</b>	6.61	3.39
<b>3,4</b>	2.85	7.15	<b>6,4</b>	6.92	3.08
<b>3,6</b>	3.22	6.78	<b>6,6</b>	7.28	2.72
<b>3,8</b>	3.55	6.45	<b>6,8</b>	7.72	2.28
<b>4,0</b>	3.85	6.15	<b>7,0</b>	8.24	1.76
<b>4,2</b>	4.13	5.86	<b>7,2</b>	8.69	1.31
<b>4,4</b>	4.41	5.59	<b>7,4</b>	9.08	0.82

<b>4,6</b>	4.68	5.32	<b>7,6</b>	9.36	0.64
<b>4,8</b>	4.93	5.07	<b>7,8</b>	9.57	0.43
<b>5,0</b>	5.15	4.85	<b>8,0</b>	9.72	0.28

#### КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ:

1. Чем определяется поверхностный заряд клетки?
2. Что такое  $\zeta$ -потенциал?
3. Что такое изоэлектрическая точка?
4. Какие сведения можно получить о свойствах поверхности частицы путем определения ее  $\zeta$ -потенциала, электрофоретической скорости, изоэлектрической точки?

#### 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 № 5.

### ЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БИОЛОГИЧЕСКИХ ТКАНЕЙ

Практически все процессы жизнедеятельности организмов сопровождаются появлением в клетках и тканях потенциалов электрической природы, называемых **биопотенциалами**. Благодаря этому как распределение биопотенциалов в организме так и их величины могут служить характеристиками для диагностики функционального состояния.

Между точками с различной величиной потенциала может протекать электрический ток. Способность среды проводить электрический ток обусловлена наличием свободных носителей заряда и характеризуется проводимостью  **$\kappa$** , где  **$\kappa$**  определяется как коэффициент пропорциональности между величиной тока и разностью потенциалов в пересчете на единицу объема. Величина  **$\kappa$**  в первую очередь зависит от концентрации свободных носителей заряда. В качестве свободных носителей заряда в клетках и тканях 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**. Связанные заряды могут накапливаться на потенциальных барьерах в количестве пропорциональном величине потенциала энергетического поля. Коэффициент пропорциональности между зарядом и потенциалом, характеризующий среду, называется **диэлектрической проницаемостью  $\epsilon$** .

При наложении на среду **внешнего поля** происходит некоторое смещение связанных зарядов в пространстве, причем заряды, имеющие разные знаки смещаются во взаимопротивоположных направлениях. В результате смещения связанные заряды создают в среде поле  $\vec{P}$ , противоположно направленное внешнему полю  $\vec{E}$  (Рис.1). Это явление называется *поляризацией*. Т.о. диэлектрическая постоянная характеризует способность вещества ослаблять внешнее электрическое поле или иными словами способность к поляризации.

Рис.1

Поляризация в среде устанавливается не мгновенно вслед за включением внешнего поля, а требует определенного времени для достижения равновесного значения, называемого временем *релаксации*. Различные механизмы возникновения поляризационных явлений обуславливают различные виды поляризации и имеют свое характерное время релаксации.

Наличие какого-либо механизма поляризации, характеризуемого постоянной времени  $\tau$ , обуславливает зависимость  $\epsilon$  и  $\kappa$  от частоты прикладываемого электрического поля. Частотная зависимость величины  $\epsilon$  и  $\kappa$ , называется *дисперсией*, и имеет следующее объяснение. На малых частотах, когда  $\tau$  много меньше периода электрических колебаний, поляризация успевает устанавливаться вслед за изменением направления поля. В этом случае диэлектрическая проницаемость и проводимость не будут изменяться с частотой. При увеличении частоты полупериод переменного тока становится меньше времени релаксации, то поляризация не успевает достигнуть максимального значения. Поэтому диэлектрическая проницаемость начинает уменьшаться с частотой, а проводимость возрастать. При значительном увеличении частоты данный вид поляризации не будет проявляться, тогда диэлектрическая проницаемость и проводимость будут определяться другими видами поляризации с меньшим временем релаксации.

При наложении внешнего поля на биологическую среду, т.е. при подключении внешних источников э.д.с., распределение потенциалов и их величины меняются и, соответственно этому, меняются токи.

По характеру отклика на внешнее электрическое поле проявляют как **пассивные** так и **активные** электрические свойства: *пассивные свойства* не

сопровождаются изменением проницаемости мембраны, а *активные свойства* сопровождаются изменением проницаемости мембраны.

Проводимость (или обратная ей величина- удельное сопротивление  $\rho=1/\kappa$ ) и диэлектрическая проницаемость биологической ткани не будут зависеть от величины электрического поля, если она не превышает некоторого **физиологического порога**. Пороговыми считаются величины напряженности  $E_{\text{пор}} \sim 6,6 \cdot 10 \text{ В/м}$  по постоянному электрическому полю и  $E_{\text{пор}} \sim 180/\sqrt{f} \text{ В/м}$  по переменному электрическому полю, где  $f$  - частота поля. Для значений поля ниже порогового величины  $\kappa$  и  $\epsilon$  отражают *пассивные электрические свойства биологических сред*.

Мягкие биологические ткани можно представить как плотную взвесь клеток. Поэтому электрические свойства биологических тканей можно изучать на клеточных взвесах. В целом электрические свойства тканей определяются электрическими свойствами ее отдельных компонентов. Основная часть ионов в протоплазме клеток в свободном состоянии и в электрическом поле ведет себя подобно ионам межклеточной среды- ионы начинают двигаться в направлении, обусловленном знаком заряда. Однако клеточные мембраны обладают малой проницаемостью для ионов, что выражается в высоком оптическом сопротивлении мембран ( $1000 \text{ Ом/см}^2$ ) в результате чего они ограничивают свободное движение ионов. При этом разноименные заряды накапливаются на противоположных сторонах мембран т.о. вызывая макроструктурную поляризацию. Макроструктурная поляризация возникает по всему объему клетки, поскольку последняя буквально пронизана мембранами, составляющими ее цитоскелет. Клеточные мембраны имеют слоистую липопротеидную природу и могут характеризоваться как слоистые диэлектрики: липиды являются типичными диэлектриками ( $\epsilon=3$ ), диэлектрическая постоянная белка несколько выше, чем у липида.

Таким образом, *электрическая емкость клетки обусловлена емкостью мембраны* ( $1 \text{ мкФ/см}^2$ ), а *электропроводность клетки обусловлена поверхностной проводимостью мембраны и внутриклеточной проводимостью*.

Поскольку электрические свойства характеризуются составом и строением биологической ткани, то метод измерения электропроводности находит применение в исследовательских и диагностических целях. С помощью этого метода можно изучать процессы связывания ионов биомакромолекулами; по величине уменьшения диэлектрической проницаемости на высоких частотах определять степень гидратации биомакромолекул. Электрические характеристики тканей важны для изучения проведения нервного импульса и проницаемости мембран.

При патологических процессах в тканях также происходят изменения их электрических свойств. Так в процессе воспаления происходит набухание клеток, объем межклеточных пространств уменьшается в результате чего увеличивается сопротивление. При разрушении биологической структуры в результате воздействия повреждающих факторов, а также при отмирании ткани происходит увеличение проницаемости мембран и как следствие, ослабление эффекта поляризации границ раздела, что приводит к падению сопротивления и емкости объекта на низких частотах. Т.о. *крутизна дисперсии*  $\frac{\partial R}{\partial \omega}$  или  $\frac{\partial C}{\partial \omega}$  *может*

служить критерием жизнеспособности ткани. Также наблюдается такая закономерность- чем интенсивнее идут процессы обмена в органах и тканях, тем большее значение принимает крутизна.

### Электрические измерения на переменном токе

Магнитные свойства биологических тканей практически не отличаются от магнитных свойств вакуума. Поэтому для объектов биологической природы электрические свойства однородного образца длиной  $d$  и площадью сечения  $S$  будут полностью описываться его емкостью  $C$  и проводимостью  $g$ :

$$g = \kappa \frac{S}{d}, \quad C = \epsilon \epsilon_r \frac{S}{d}$$

где  $\epsilon_0 = 8,85 \cdot 10^{-12}$  Ф/м диэлектрическая постоянная вакуума. На практике в электротехнических измерениях чаще пользуются величиной  $R = 1/g$ , которая характеризует *активное сопротивление* образца.

Для активного сопротивления мгновенное значение э.д.с.  $u(t) = u_m \cos \omega t$ , а мгновенное значение силы тока:

$$i(t) = \frac{u_m}{R} \cos \omega t = I_m \cos \omega t$$

где  $\omega$ - циклическая частота тока или напряжения.

В случае идеального конденсатора ток в подводящих проводах численно равен изменению заряда на обкладках конденсатора за единицу времени:

$$i = \frac{dq}{dt}$$

Мгновенное значение заряда конденсатора определяется его емкостью и мгновенным значением э.д.с.

$$q(t) = CU(t) = CU_m \cos \omega t$$

$$i = \frac{d}{dt}(CU_m \cos \omega t) = -\omega C U_m \sin \omega t =$$

$$= \omega C U_m \cos\left(\omega t + \frac{\pi}{2}\right)$$

Поскольку  $I_m = \omega C U_m$  или  $I_m = \frac{U_m}{\frac{1}{\omega C}}$ , то  $X_c = \frac{1}{\omega C}$  представляет

*реактивное сопротивление* (в данном случае *емкостное*). Фаза емкостного тока в идеальном конденсаторе опережает фазу внешней э.д.с. на  $\pi/2$ .

В реальных образцах присутствует как реактивная составляющая так и активная составляющая сопротивления, характеризующая потери. Конденсатор с потерями может быть представлен в виде двух эквивалентных схем:

Рис. 2

Векторная диаграмма, показанная на рис.2а представляет собой векторную сумму падения напряжения на **C** и **R**.

векторная диаграмма, показанная на рис. 2б, строится на основании 1-го закона Кирхгоффа- *векторная сумма амплитуд токов в ветвях равна амплитуде тока до разветвления*. В обоих случаях присутствие активного сопротивления приводит к уменьшению сдвига фаз между внешней э.д.с. и током на угол  $\delta$ , называемым *углом потерь*. Тангенс угла потерь является мерой рассеяния энергии.

Для последовательной схемы  $\operatorname{tg} \delta = R \omega C$ ,

для параллельной-  $\operatorname{tg} \delta = \frac{1}{R \omega C}$ .

Если участок цепи, кроме активного сопротивления **R** содержит реактивное сопротивление, то полное сопротивление удобно представить в комплексном виде обозначаемом **Z**:

-для последовательной схемы (рис.2а)

$$Z = R - i \frac{1}{\omega C}$$

-для параллельной схемы (рис. 2б)

$$\frac{1}{Z} = \frac{1}{R} + i \omega C$$

или

$$Z = \frac{R}{1 + i \omega C R} = \frac{R - i \omega C R^2}{1 + (\omega C R)^2} = \frac{R}{1 + (\omega C R)^2} -$$

$$-i \frac{\omega C R^2}{1 + (\omega C R)^2} = R \quad -iX$$

Модуль величины  $|Z| = \sqrt{(R^2 + X^2)}$  называется *импедансом*.

Удельную электропроводность и диэлектрическую проницаемость можно определить с помощью **мостовой** схемы (рис.3). *Мостовой метод* сводится к сравнению неизвестного сопротивления **Z<sub>x</sub>** с образцовым переменным сопротивлением **Z<sub>y</sub>**. Условия равновесия моста выводятся из правил Кирхгоффа:

- 1) алгебраическая сумма токов, сходящихся в любом узле (A,B,C,D)  $\sum I_k = 0$
- 2) алгебраическая сумма падений напряжения на участках контура равна алгебраической сумме э.д.с. встречающихся при обходе контура:

$$\sum I_k R_k = \sum \varepsilon_k$$

Рис.3

При условии точного баланса моста ток в диагонали CD отсутствует. Условия равновесия моста наблюдаются если:

$$\frac{Z_x}{Z_{\text{э}}} = \frac{Z_1}{Z_2} \quad \text{или} \quad Z_x \cdot Z_2 = Z_{\text{э}} \cdot Z_1$$

Два комплексных числа равны друг другу, если равны их модули и аргументы т.е.

$$1) |Z_x| \cdot |Z_2| = |Z_{\text{э}}| \cdot |Z_1|$$

$$2) \varphi_x + \varphi_2 = \varphi_{\text{э}} + \varphi_1$$

В качестве  $Z_1$  и  $Z_2$  можно выбрать активные сопротивления тогда

$$1) |Z_x| \cdot R_2 = |Z_{\text{э}}| \cdot R_1$$

$$2) \varphi_x = \varphi_{\text{э}}$$

На практике для измерения емкости конденсаторов с потерями пригодны две измерительные схемы моста при параллельной и последовательной схеме замещения (рис.4):



Рис.4

Условие равновесия для этих двух схем идентичны:

$$C_x = C_\varepsilon \frac{R_2}{R_1}; R_x = R_\varepsilon \frac{R_1}{R_2}$$

Последовательную схему включения  $R$ ,  $C$ , целесообразно применять при малых потерях, а параллельную- при больших потерях. Замена представления электрических свойств реальной системы в виде электрической схемы, составленной из элементов с сосредоточенными параметрами называется **методом эквивалентных схем**.

При изучении электропроводности биологических объектов можно использовать эквивалентные схемы с параллельным включением емкости и сопротивления.

Однако данные схемы не могут в полной мере соответствовать описанию пассивных электрических свойств биологической ткани. Результатом несоответствия является частотная зависимость свойств- результатом представления параллельной схемы к виду последовательной схемы является частотная зависимость  $R_\omega$  и  $X_\omega$

$$R_\omega = \frac{R}{1 + (\omega C R)^2}; X_\omega = \frac{\omega C R^2}{1 + (\omega C R)^2}$$

Частотную зависимость свойств можно получить, меняя частоту переменного тока, подводимого в диагональ питания АВ (рис.3).

Векторная диаграмма частотной зависимости импеданса показана на рис.5.

Рис.5

Для более полного описания рассматриваются более сложные схемы, например, показанные на рис.6.

Рис.6. Эквивалентная схема для описания электрических свойств эритроцитов:  $R$  - сопротивление межклеточной жидкости;  $C$  - емкость мембраны клеток;  $R_i$  - сопротивление внутриклеточной среды;  $R_m$  - сопротивление мембраны клеток.

Электрические свойства биологического объекта, включенного в двухэлектродную схему измерения должны учитывать сопротивления  $R_{эл.1,2}$ , емкость  $C_{эл.1,2}$  приэлектродных слоев. Поэтому в эквивалентную схему необходимо ввести еще 2 последовательных соединения, необходимо последовательно добавить параллельно соединенные сопротивления  $R_{эл.1,2}$  и емкости  $C_{эл.1,2}$ .

**Цель работы:** изучить дисперсию электропроводности взвеси клеток и изменение ее характера в результате воздействия внешнего фактора.

**Необходимые приборы, принадлежности, материалы:**

- измерительная установка (мост переменного тока Р568, генератор ТЗ-33, индикатор нуля Ф550);
- измерительная ячейка, центрифуга, мерные капиллярные трубочки для гематокритов, шприцы, бюксы, пробирки;
- дрожжевые клетки или эритроциты, вода или физраствор.

**Ход работы:**

Перед началом выполнения работы следует внимательно изучить описание измерительной установки, подготовку прибора к работе и порядок работы (см. Приложение2).

**Задание 1. Изучение влияния внешнего фактора на характер дисперсии клеточных взвесей.**

1. Приготовить 10% взвесь клеток.
2. С помощью шприца заполнить измерительную ячейку приготовленной взвесью.
3. Произвести измерение сопротивления и емкости образца на частотах 100, 200, 300, 500, 700, 1000, 2000, 3000, 5000, 7000, 10000 Гц. При этом тумблер эквивалентной схемы замещения должен соответствовать положению параллельной или последовательной схеме соединения  $R$  и  $C$ . После измерений обязательно промыть (с помощью шприца) ячейку и высушить ее.
4. Подвергнуть взвесь клеток воздействию внешнего фактора (УФ облучение, гипо- или гипертермия и т.д.).
5. Заполнить ячейку клеточной взвесью, которая подвергалась воздействию, и произвести измерение сопротивления и емкости на тех же частотах, что и в п.3.
6. Результаты измерений п.3 и 5 представить в виде таблиц и графиков  $R(\omega)$ ,  $C(\omega)$  в удобном масштабе, определить по графику крутизну дисперсии на частоте 1кГц. Объяснить полученные результаты.

**Задание2. Определение сопротивления однородных клеточных взвесей.**

Простая геометрия (представление клеток в виде сфер в проводящей среде) позволяет рассчитать их электрические свойства по формуле Максвелла (примечание) из результатов измерения электропроводности всей системы и дисперсной среды.

Постоянная геометрия образца обуславливает однозначную связь между  $R$  и  $\kappa$ ,  $C$  и  $\epsilon$  (см. примечание ф-ла 5). Исходя из этого, а также пренебрегая вкладом приэлектродной поляризации формулу (5) можно представить в виде:

$$\frac{R_1 - R}{R_1 + 2R} = \delta \frac{R_1 - R_2}{R_1 + 2R_2} \quad (1) \text{ для описания проводящих свойств, либо}$$

$$\frac{C - C_1}{C + C_2} = \delta \frac{C_2 - C_1}{C_2 + 2C_1} \quad (2) \text{ для описания диэлектрических свойств,}$$

где  $R$  и  $C$  - сопротивление и емкость ячейки, заполненной взвесью;

$R_1$  и  $C_1$  - сопротивление и емкость ячейки, заполненной дисперсионной средой;

$R_2$  и  $C_2$  - сопротивление и емкость ячейки, заполненной клетками;

$\delta$  - удельный объем заполненный клетками.

Чтобы получить дисперсию  $R_2$  и  $C_2$  по формуле (1,2) необходимо:

1. Измерить частотную зависимость сопротивления  $R_1$  и емкость  $C_1$  ячейки, заполненной дисперсионной средой, на тех же частотах, что указаны в п.3

2. Определить объемную долю  $\delta$ , которую составляют клетки в используемой 10% взвеси. Для этой цели можно использовать капилляры с мерной шкалой, которые применяются для определения гематокрита. Гематокритную трубочку заполняют с помощью шприца или пипетки тщательно взболтанной клеточной взвесью. Заполненную трубочку устанавливают в центрифужной гильзе и уравнивают либо другой трубочкой, либо стеклянной палочкой соответствующих размеров и веса. После центрифугирования в течение **20 мин.** при **3500 об/мин** измеряют длину  $h$  всего столба, отсчитывая число делений по мерной шкале, и длину столба  $h_2$ , соответствующую объему, занятому клетками. Объемную долю  $\delta$  находят по формуле:  $\delta = h_1 / h_2$

3. Подставить в формулы (1,2) измеренные величины  $\delta$ ,  $R_1$ ,  $C_1$ . В качестве значений  $R$  и  $C$  использовать данные, полученные в задании 1. Рассчитанные значения  $R_2$  и  $C_2$  изобразить на графике в виде зависимости  $C_2$  и  $1/R_2$  от  $\lg \omega$ .

#### КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ:

1. Каковы особенности электропроводности живых тканей? Пассивные и активные свойства?
2. Что такое поляризация и какие виды поляризации вы знаете?
3. Охарактеризовать дисперсию электропроводности типичную для биологической ткани?
4. Использование электрических свойств биологических тканей в исследовательских и практических целях?

## ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА:

1. Г. Шван. Спектроскопия биологических веществ в поле переменного тока - в сб.: Электроника и кибернетика в биологии и медицине. М., Изд-во ин. лит-ры, 1963.
2. И. И. Губанов, А. А. Утепбергенов. Медицинская биофизика. М., "Медицина", 1978.

### Примечание

В случае двухкомпонентной системы, характеризующейся диэлектрической проницаемостью  $\epsilon_1$  и  $\epsilon_2$ , предполагая сферическую форму включений, имеющих обобщенную долю  $\delta$  электрическое поле внутри шарообразной однородной частицы равно

$$\overline{E}_1 = \frac{3\epsilon_a}{2\epsilon_a + \epsilon_1} E_a \quad (1)$$

где  $\epsilon_a$  - диэлектрическая проницаемость окружающей частицу среды

$E_a$  - напряженность внешнего по отношению к частице поля.

При малых концентрациях  $\delta$  среде можно считать,  $\epsilon_a \cong \epsilon_2$ , а  $\overline{E}_a = \overline{E}$

В этом случае диэлектрическая проницаемость смеси:

$$\epsilon = \epsilon_2 \left(1 + 3\delta \frac{\epsilon_1 - \epsilon_2}{\epsilon_1 + 2\epsilon_2}\right) \quad (2)$$

В более общем случае под окружающей частицу средой следует понимать самую гетерогенную среду с диэлектрической проницаемостью  $\epsilon_a = \epsilon_{ni}$

В этом случае

$$\epsilon = \frac{\epsilon_2}{1 - 3\delta \frac{\epsilon_1 - \epsilon_2}{\epsilon_1 + 2\epsilon_2}} \quad (3)$$

Метод Лоренца для расчета поля, поляризующего частицу, дает другой вид

$$\overline{E}_a = \frac{\epsilon + 2\epsilon_2}{3\epsilon_2} \overline{E}$$

Подставляя это выражение в формулу (1) получим

$$\epsilon = \epsilon_2 + \delta(\epsilon_1 - \epsilon_2) \frac{\epsilon + 2\epsilon_2}{\epsilon_1 + 2\epsilon_2} \quad (4)$$

Произведем сравнение формул (2), (3), (4). Применимость формулы (2) обусловлена малостью  $\delta$ . Оценка дает следующее соотношение

$$\delta \ll \frac{\epsilon_1 + 2\epsilon_2}{|\epsilon_1 - \epsilon_2|}$$

Отсюда видно, что чем больше разность между диэлектрической проницаемостью включений и среды, тем меньше область значений  $\delta$ , при которых можно пользоваться формулой (2).

При достаточно больших  $\delta$  необходим учет взаимного влияния включений, что учитывают формулы (3) и (4). Расчет по формуле (3) дает симметричный результат относительно того, под каким индексом понимать реду, а под каким включения.

Симметричность формулы (3) относительно индексов указывают на то, что она описывает системы типа статистической смеси, когда обе компоненты в рассмотрении являются равноправными. В этом случае можно записать соотношение:

$$\frac{\epsilon_1 - \epsilon}{\epsilon_1 + 2\epsilon} \delta + \frac{\epsilon_2 - \epsilon}{\epsilon_2 + 2\epsilon} (1 - \delta) = 0$$

Формула (4) по сравнению с (3) дает несколько меньшее значение для случая  $\epsilon_1 > \epsilon_2$  и несколько большее для случая  $\epsilon_1 < \epsilon_2$ .

При  $\epsilon_1 \cong \epsilon_2$  результаты расчета по формуле (4) соответствуют результатам расчета по формуле (3).

Формула (4) в действительности отражает диэлектрическую проницаемость двуслойного шара, состоящего из частицы включения, вокруг которой имеется сферическая оболочка из среды; размеры двуслойного шара определяются соотношением  $\left(\frac{r_1}{r_0}\right)^3 = \delta$ , где  $r_1$  - радиус частицы, а  $r_0$  - внешний радиус оболочки.

Т.о. формула (4) выражает диэлектрическую проницаемость среды, полностью состоящей из ячеек в виде двухблочных сферических образований.

Пользуясь формальной аналогией можно перенести получаемые результаты для описания проводимости гетерогенных дисперсных систем. В частности соотношение (4), выражающее диэлектрическую проницаемость среды с однородными включениями сферической формы, в терминах электропроводности запишется так:

$$\frac{\sigma - \sigma_0}{\sigma + 2\sigma_0} = \delta \frac{\sigma_1 - \sigma_0}{\sigma_1 + 2\sigma_0} \quad (5)$$

где  $\sigma_1$ ,  $\sigma_0$  и  $\sigma$  - проводимость включений среды и смеси соответственно. Уравнение впервые записано Максвеллом в "Трактате об электричестве и магнетизме" и носит его имя.

### Лабораторная работа № 6

## ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ УЛЬТРАФИОЛЕТОВОГО ОБЛУЧЕНИЯ НА ПОВЕРХНОСТНОЕ НАТЯЖЕНИЕ ЛИПИДНЫХ ПЛЕНОК

Исследование **мономолекулярных слоев (монослоев)** дает информацию о таких физических параметрах индивидуальных веществ, как поверхностное давление монослоя, молекулярная площадь вещества в монослое, зависимость поверхностного давления от молекулярной площади. Для смеси веществ можно получить информацию о смешиваемости компонентов, о стехиометрии и энергетике взаимодействий, о сродстве водорастворимых веществ к липидам. **Метод монослоев** служит основой для получения мультислоев ориентированной липидной системы и создания модельных мембран заданного состава и их архитектоники. Монослойную методику используют также на практике, например в микроэлектронной технологии для ориентации и сборки компонентов и др.

Определяющую роль в свойствах тонких жидких пленок и капиллярных явлениях 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  $\Delta F$ , приходящийся на единицу площади поверхности раздела фаз  $\Delta S$ , характеризуется *коэффициентом поверхностного натяжения  $\sigma$* :

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

Часто величину  $\sigma$  называют просто *поверхностным натяжением*. Величину  $\sigma$  измеряют в Дж/м<sup>2</sup> 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.

С повышением температуры различие в плоскостях жидкости и ее насыщенного пара уменьшается. В связи с этим коэффициент поверхностного натяжения уменьшается (см. Примечание 1) и при критической температуре он обращается в нуль. Растворенные в жидкой фазе вещества также влияют на величину поверхностного натяжения. Например, растворение солей приводит к увеличению коэффициента поверхностного натяжения (см. Примечание 2). С другой стороны существуют вещества, способные адсорбироваться на поверхности раздела фаз и значительно понижать поверхностное натяжение. Эти вещества называют *поверхностно-активными (ПАВ)*. Поверхностно-активными веществами являются многие органические соединения в водном растворе, у которых молекулы наряду с полярными гидрофильными группами содержат неполярные углеводородные радикалы. Изначально равномерно растворенные по всему объему в малом количестве ПАВ будут стремиться к адсорбции на границе раздела в виде монослоя. Тогда разность

$$\Delta\sigma = \sigma_0 - \sigma \quad (2),$$

(где  $\sigma_0$  - поверхностное натяжение для чистой воды,  $\sigma$  - поверхностное натяжение после адсорбции ПАВ на границе раздела) соответствует *поверхностному давлению монослоя*.

Структура липидов, составляющих мембрану, в значительной степени оказывает влияние на механические свойства мембраны: *вязкость, поверхностное натяжение*, определяющие прочность мембраны и ее *стойкость к внешним воздействиям* (изменение осмотического давления и т.д.). Также известно, что под влиянием ультрафиолетового облучения ненасыщенные жирные кислоты подвергаются окислительным превращениям с образованием разнообразных продуктов. Результаты таких превращений зависят от наличия в молекуле двойных связей, их расположения. Такие изменения, естественно,

приведут к изменениям характера и сил межмолекулярного взаимодействия между углеводородными цепочками молекул.

Хорошей моделью для исследования таких воздействий могут служить мономолекулярные пленки, которые можно получить, если поместить на поверхность воды небольшое количество жирной кислоты. Растекаясь по поверхности воды, молекулы ориентируются полярными головками к поверхности воды, а гидрофобными цепочками - в воздух. Хорошо упорядоченные ориентированные монослои, которые получают методом Ленгмюра-Блоджет называются *ленгмюровскими слоями*. Для измерения поверхностного натяжения пленки, образованной такими слоями можно использовать метод "отрыва кольца" (см.рис.).

**Метод отрыва кольца** основан на том, что поверхностное натяжение можно также 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.

Рис.

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

$$\sigma = \frac{P - P_0}{2\pi r} \quad (3),$$

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

**P**<sub>0</sub>- абсолютный вес кольца [**Н**];

**r**- наружный радиус кольца, [**м**].

Поскольку весы отградуированы в единицах массы, поэтому формулу (3) удобно привести к виду:

$$\sigma = \frac{g(m - m_0)}{2\pi r} \quad (3a),$$

где **g**- ускорение свободного падения, равное **9,81 м/с<sup>2</sup>**;

**m** и **m**<sub>0</sub>- 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.

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

**Необходимое оборудование, принадлежности и материалы:**

-торсионные весы ВТ-500, УФ лампа, кольцо, чашки Петри, стеклянная палочка;

-дистиллированная вода, глицерин, этанол, линетол.

**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  $m_0$ . 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 закрепленном арретире.*
4. Провести 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  $\Delta r$ , оценить  $\Delta \sigma$ . Сравнить  $\bar{\sigma}$  с табличным значением  $\sigma$  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 (3 или 3а) для расчета  $\sigma$  ограничено. Поэтому при получении значения  $\sigma$  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  $\sigma_x$  неизвестной жидкости выражается как

$$\sigma_x = \sigma_1 + \frac{\sigma_2 - \sigma_1}{P_2 - P_1} \cdot (P_x - P_1) \quad (4)$$

или

$$\sigma_x = \sigma_1 + \frac{\sigma_2 - \sigma_1}{m_2 - m_1} \cdot (m_x - m_1) \quad (4a)$$

где  $\sigma_1$  и  $\sigma_2$  - 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 влияние 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?

#### ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА:

1. 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  $\sigma$  для раствора, концентрация которого равна 1г-экв/л ( $\Delta\sigma$  при 20°C для : KCl - 1,4; NaCl - 1,64.

### Лабораторная работа № 7

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОГО ВЕСА ИЗОПИЕСТИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

Важнейшей характеристикой молекулы является ее *относительная молекулярная масса* ( или *молекулярный вес* ) - выраженная в единицах атомной массы сумма масс всех атомов, входящих в состав данной молекулы.

В отличие от низкомолекулярных соединений для высокомолекулярных соединений понятие о молекуле и молекулярной массе имеет свои особенности. Для линейных синтетических полимеров, в том числе полипептидов и полинуклеотидов, будет иметь место распределение частиц по молекулярным массам - полимолекулярность, что обусловлено различной степенью полимеризации полимерных молекул. Различия в длине полимерных молекул одного типа существенно не сказываются на их химических свойствах. А молекулярный вес полимолекулярной системы может быть охарактеризован статистически усредненной величиной, которая будет зависеть от вида функции молекулярно-весового распределения.

Молекулы биологического происхождения - *биополимеры* должны характеризоваться постоянством состава, что обусловлено их индивидуальностью и специфичностью. Т.о., образец биополимера должен содержать практически идентичные макромолекулы, характеризующиеся одинаковым значением молекулярного веса. Однако, как правило, образцы биополимеров содержат низкомолекулярные примеси или включения, которые не возможно удалить без разрушения структуры макромолекулы; т.е. взятый для исследования природный высокомолекулярный продукт реально представляет собой ту или иную смесь молекул с различным молекулярным весом в зависимости от жесткости условий выделения и степени очистки.

Различные способы усреднения молекулярной массы имеют различное представление средней молекулярной массы в экспериментальных методах. Наиболее часто при определении молекулярного веса полимолекулярной системы имеют дело со **среднечисловым** или **средневзвешенным** значениями молекулярной массы.

**Среднечисловое значение  $M_n$**  представляет собой отношение суммарной массы всех молекул, находящихся в системе, к общему числу этих частиц, т.е. является средним арифметическим значением молекулярной массы. Действительно, если полимолекулярная система содержит  $N_i$  молекул  $i$ -го сорта с молекулярным весом  $M_i$ , то имеем:

$$\bar{M}_n = \frac{\sum_i M_i N_i}{\sum_i N_i} \quad (1)$$

Если выразить числовую долю молекул  $i$ -того сорта как

$$X_i = \frac{N_i}{\sum_i N_i} \quad (2)$$

и разделить числитель и знаменатель в формуле (2) на число Авогадро  $N_A$ , то по сути дела  $x_i$  выступает в качестве мольной доли. Выражение для  $\bar{M}_n$  может быть представлено в более удобном виде :

$$\bar{M}_n = \sum_i M_i X_i \quad (3)$$

**Средневзвешенное** ( или **средневесовое** ) значение  $\bar{M}_w$  представлено "массовыми" вкладами молекул  $i$ -го сорта. Эти вклады будут тем больше, чем большее значение имеет произведение  $M_i N_i$ . В этом случае весовая доля  $w_i$  выражается как :

$$w_i = \frac{M_i N_i}{\sum_i M_i N_i} \quad (4)$$

Тогда средневзвешенное значение  $\bar{M}_w$  :

$$\bar{M}_w = \sum_i M_i w_i = \frac{\sum_i M_i^2 N_i}{\sum_i M_i N_i} \quad (5)$$

Следует иметь ввиду, что значения  $\bar{M}_n$  и  $\bar{M}_w$  для одного и того же образца при наличие полимолекулярности могут значительно отличаться. Реальная система из-за присутствия загрязняющих примесей всегда является полимолекулярной, поэтому следующее значение верно при определении молекулярной массы не только для высокомолекулярных соединений, а именно: анализ формул (1), (3), (5) показывает, что присутствие низкомолекулярных примесей сильнее сказывается на значении  $\bar{M}_n$ , а присутствие такого же количества высокомолекулярных примесей сильнее сказывается на значении  $\bar{M}_w$ .

Среднечисловое значение молекулярной массы  $\bar{M}_n$  экспериментально определяют методами, позволяющими "сосчитать" число частиц. В основном это методы, которые основаны на **коллигативных свойствах** растворов, а именно: **изотермическая перегонка** или **изопиестический метод**, **эбулиоскопический метод**, **криоскопический метод**, **метод осмометрии**.

Средневзвешенное значение молекулярной массы  $\bar{M}_w$  получают в экспериментах по изучению **диффузии**, а также в **методах светорассеяния**, **приближения к седиментационному равновесию** и некоторых других.

Под **коллигативными свойствами** растворов подразумевают следующие 4 свойства разбавленных растворов нелетучего соединения в летучем растворителе:

1. Понижение давления пара растворителя.
2. Повышение температуры кипения раствора по сравнению с чистым растворителем.

3. Понижение температуры замерзания раствора по сравнению с чистым растворителем.

4. Явление осмоса.

Эти свойства, положенные в основу соответствующих методов, называются **коллигативными** (что означает *коллективные*), поскольку они зависят от количества растворенных частиц (молекул или ионов) и не зависят от их природы, пока они находятся в жидкой фазе раствора.

Количественное описание 1-го и 2-го свойств основано на законе Рауля, согласно которому *давление паров  $P_i$   $i$ -го вещества над его раствором определяется соотношением:*

$$P_i = X_i P_i^{\circ}, \quad (6)$$

где  $X_i$  - мольная доля  $i$ -го компонента,

$P_i^{\circ}$  - давление пара чистого  $i$ -го вещества при данной температуре.

В тех случаях, когда некоторое растворенное вещество является нелетучим, т.е. имеет пренебрежимо малое давление пара, то давление пара раствора равно парциальному давлению пара растворителя. Для идеальных растворов давление пара растворителя определяется законом Рауля

$$P_1 = X_1 P_1^{\circ} = (1 - X_2) P_1^{\circ}, \quad (6a)$$

где индекс "1" относится к растворителю, а индекс "2" относится к нелетучему растворенному веществу.

Для неидеальных растворов это уравнение применимо, когда мольная доля растворенного вещества  $X_2$  достаточно мала, и поэтому влиянием растворенного вещества на растворитель можно пренебречь.

### Изопнестический метод

Сущность этого метода заключается в следующем. Если растворы двух нелетучих веществ, растворенных в одном и том же растворителе будут помещены в закрытый сосуд и разделены между собой воздушным пространством, то согласно закону Рауля над первым и вторым растворами устанавливается давление паров  $p_1$  и  $p_2$  пропорциональное мольной доле растворителя в первом и втором растворах. Если давление паров растворителя над двумя растворами равно ( $p_1 = p_2$ ), то скорость испарения равна скорости конденсации и, таким образом, объемы растворов в течение времени не изменяются. Если первоначальное давление пара над одним раствором отличается от давления пара над другим, то растворитель из раствора с большим давлением пара будет переходить в раствор с меньшим давлением, пока давление паров над растворами не уравнивается. При этом происходит изменение объемов растворов.

Согласно закону Рауля (6a)

$$P_1 = X_1 P_0 \quad \text{и} \quad P_2 = X_2 P_0,$$

где  $X_1$  и  $X_2$  - мольные доли растворителя соответственно в первом и втором растворах;

$P_0$  - упругость паров чистого растворителя.

Если давление паров обоих растворов равны т.е.  $P_1 = P_2$ , то соответственно равны мольные доли растворителя в этих растворах т.е.  $X_1 = X_2$ . Поскольку

$$X_1 = \frac{n_{1p-ля}}{n_1 + n_{1p-ля}}, \quad \text{а} \quad X_2 = \frac{n_{2p-ля}}{n_2 + n_{2p-ля}}, \quad (7)$$

где  $n_1$  и  $n_2$ - количество молей растворенных веществ в первом и втором растворах;

$n_{1р-ля}$  и  $n_{2р-ля}$ - количество молей растворителя в первом и втором растворах, то

$$\frac{n_{1р-ля}}{n_1 + n_{1р-ля}} = \frac{n_{2р-ля}}{n_2 + n_{2р-ля}} \quad (8)$$

Последнее соотношение можно привести к виду

$$\frac{n_{1р-ля}}{n_1} = \frac{n_{2р-ля}}{n_2} \quad (8a)$$

С учетом того, что количество молей вещества  $n_i$  равняется отношению массы  $m_i$  этого вещества к его молекулярному весу  $M_i$ , т.е.

$$n_i = \frac{m_i}{M_i} \quad (9)$$

соотношение (8a) после преобразования принимает вид:

$$\frac{M_1}{M_2} = \frac{M_{2р-ля}}{M_2} \cdot \frac{M_1}{M_{1р-ля}} \quad (8б)$$

Окончательно имеем:

$$\frac{M_1}{M_2} = \frac{C_1}{C_2} \quad (8в)$$

где  $C_1$  и  $C_2$  - количество граммов растворенного вещества на **1000г** растворителя, соответственно, в первом и втором растворах.

*Если в качестве одного из веществ взять вещество с известной молекулярной массой - эталон, а в качестве другого - вещество, молекулярную массу которого необходимо определить, и приготовить растворы этих веществ, то можно подобрать такое соотношение концентраций этих растворов, при котором изменения объемов растворов с течением времени происходить не будет.* Тогда молекулярную массу исследуемого вещества можно определить по формуле:

$$M_u = \frac{C_u}{C_s} \cdot M_s \quad (10)$$

где  $C_u$  и  $C_s$  - концентрации исследуемого и эталонного веществ;

$M_u$  и  $M_s$  - молекулярные массы исследуемого и эталонного веществ.

Изопиестический метод определения молекулярного веса достаточно чувствителен и может использоваться в широком интервале молекулярных весов, однако и эталонное, и исследуемое вещества должны отвечать следующим требованиям:

- 1) и эталон, и исследуемое вещества должны быть намного менее летучими, чем растворитель;
- 2) и эталон, и исследуемое вещества не должны химически реагировать с растворителем;
- 3) растворенные вещества не должны ассоциировать, не диссоциировать в процессе эксперимента.

Постоянство температуры в эксперименте обеспечивается термостатированием образцов.

**Цель работы:** определить молекулярный вес неизвестного вещества изопиестическим методом.

**Необходимое оборудование, принадлежности и материалы:**

- эталонное и исследуемое вещества ( их 1% растворы );
- капилляры (внутренний диаметр 0,5-1,2 мм, длина 40-50 мм), герметик, шприц, планшет, микроскоп.

**Ход работы.**

1. В качестве закрытого сосуда используется стеклянная капиллярная трубка (диаметр **0,5-1,2 мм**, длина **30-40мм**), которая заполняется с одного конца раствором эталонного вещества, а с другого конца раствором исследуемого вещества, так чтобы между заполненными частями капилляра оставался воздушный промежуток длиной около **10 мм** (рис.1). После заполнения капилляр с обоих концов запечатывается герметиком (пластилином), который бы не реагировал с растворами.

рис. 1

Заполнение капилляра удобно производить с помощью шприца, используя при этом один шприц для раствора эталонного вещества, другой шприц для раствора исследуемого вещества. Перед заполнением следует убедиться, чтобы капилляр и шприцы были чистые и сухие. При запечатывании капилляра с целью маркировки концов, заполненных растворами эталонного и исследуемого вещества, удобно воспользоваться пластилином разного цвета.

Вблизи наблюдаемых, в виде менисков, границ воздушного промежутка с растворами снаружи капиллярной трубки следует нанести маркерные метки, относительно которых будет производиться отсчет изменения длины соответствующих заполненных частей.

2. Провести наблюдение изменения положения менисков в капилляре под микроскопом. Для этого разместить капилляр на планшете и установить планшет на микроскопный столик. Установить увеличение объектива  $\times 4$  и настроить микроскоп, добиваясь резкого изображения объекта и окулярной микрометрической шкалы.

Измерить расстояния между маркерной меткой и центральной частью мениска для растворов эталонного и исследуемого вещества. Через 5, 10, 15 минут произвести последующие измерения положения менисков относительно маркерных меток.

Результаты измерений занести в таблицу:

концентрация растворов веществ	длина $l_i$ ( в делениях шкалы)	
	эталонное в-во	исследуемое в-во

эталон	исследуемое	t <sub>0</sub>	t <sub>1</sub>	t <sub>2</sub>	t <sub>3</sub>	t <sub>0</sub>	t <sub>1</sub>	t <sub>2</sub>	t <sub>3</sub>

3. Произвести выбор интервала концентраций для последующих разведений. Как показано на рис.2, для образца возможны 3 случая изменения положения мениска:

- а) уменьшение части, заполненной раствором эталонного вещества, и увеличение части, заполненной раствором исследуемого вещества, означает, что  $P_3 > P_n$  ;
- б) увеличение части, заполненной раствором эталонного вещества, и уменьшением части, заполненной раствором исследуемого вещества, означает, что  $P_3 < P_n$  ;
- в) объемы частей с течением времени заметно не изменяются, что указывает на равновесие  $P_3 = P_n$ .

рис. 2

В первом случае необходимо произвести разведение раствора с исследуемым веществом в 1,5 и 3 раза. Концентрацию раствора с эталонным веществом оставить без изменения. Приготовить образцы с разведенными растворами исследуемого вещества как указано в п.1.

Во втором случае необходимо разбавить раствор эталонного вещества в 1,5 и 3 раза, а концентрацию раствора с исследуемым веществом оставить без изменения. Приготовить образцы с этими концентрациями растворов.

В третьем случае с целью получения более точного значения концентрации, соответствующей равновесному давлению, один образец заполняется разбавленным в 1,5 раза раствором эталонного вещества и раствором исследуемого вещества без изменения; другой образец заполняется разбавленным в 1,5 раза раствором исследуемого вещества и раствором эталонного вещества без изменения.

В любом из трех случаев производится наблюдение как описано в п.2 для двух образцов, результаты заносятся в таблицу и находится **интервал чувствительных концентраций**. *Интервал чувствительных концентраций* определяется двумя ближайшими соотношения концентраций *эталон-исследуемое вещество*, для которых характерно изменение направления смещения менисков в капилляре.

4. Произвести разбиение интервала чувствительных концентраций на 3 равных подинтервала, приготовив соответствующие разведения растворов чувствительных концентраций. Подготовить образцы с этими разведениями, провести измерения (увеличивая, соответственно, время наблюдения), занести результаты в таблицу и уточнить интервал чувствительных концентраций.

5. Произвести последующее уточнение интервала концентраций, аналогично процедуре, описанной в п.4. Искомое значение концентрации, соответствующей



равновесному давлению паров, определяется как среднее для значений чувствительных концентраций.

6. По формуле (10) найти значение молекулярной массы исследуемого вещества, произвести оценку погрешности. *Необходимо учесть, что в формуле (10) фигурирует концентрация  $C$ , выраженная как масса в граммах растворенного вещества в 1000г растворителя. Поэтому, если в ходе работы и используется процентное выражение концентрации, то ее необходимо пересчитать по формуле:*

$$C = \frac{1000 \cdot [C\%]}{100 - [C\%]}$$

#### КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ:

1. Какие методы определения молекулярной массы вам известны?
2. Сформулируйте закон Рауля применительно для растворов нелетучего соединения в летучем растворителе.
3. Покажите, что  $M_w$  более чувствительна к наличию высокомолекулярных примесей, а  $M_n$  более чувствительна к наличию низкомолекулярных примесей.
4. Назовите требования, предъявляемые к веществам, для которых можно определить их молекулярный вес изопиестическим методом.

#### ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА:

1. Рафиков С.Р. Введение в физико-химию растворов полимеров, М., 1978г.
2. Рафиков С.Р., Твердохлебова И.И., Павлова С.А. Методы определения молекулярных весов и полидисперсности высокомолекулярных соединений, М., 1963г.

#### Лабораторная работа № 8.

### ИЗУЧЕНИЕ КИНЕТИКИ ОБРАЗОВАНИЯ БЕЛКОВО-УГЛЕВОДНЫХ КОМПЛЕКСОВ МЕТОДОМ ПОЛЯРИМЕТРИИ.

Многие вещества обладают свойством поворачивать плоскость поляризации линейно поляризованного света. Вещества, обладающие этим свойством, получили название *оптически активных*. Оптической активностью обладают вещества, играющие важную роль в биологических процессах - углеводы, белки, нуклеиновые кислоты и другие.

Поскольку электрический вектор  $\vec{E}$  линейно поляризованной волны можно представить в виде суммы двух векторов  $\vec{E}_L$  и  $\vec{E}_D$  постоянной величины, вращающихся в противоположных направлениях с одинаковой частотой  $\omega$ , то оптическая активность является результатом кругового двулучепреломления, т. е. разных скоростей распространения в среде света, поляризованного по кругу вправо и влево. Скорость распространения света в среде характеризуется показателем преломления: для левой циркулярно поляризованной волны  $n_L$  (или  $n_-$ ), для правой -  $n_D$  (или  $n_+$ ). В том случае если для среды  $n_L = n_D$ , вращения плоскости поляризации не происходит.

При прохождении света через оптически активную среду угол вращения плоскости поляризации выражается формулой:

$$\varphi = \frac{\pi}{\lambda} l (n_L - n_D) , \quad (1)$$

где  $\lambda$  - длина волны света;

$l$  - длина пути света в веществе.

**Удельным вращением**, характеризующим растворы оптически активных веществ, называют величину

$$\varphi_{уд} = \frac{\varphi}{lc} = \frac{\pi}{\lambda c} (n_L - n_D) , \quad (2)$$

где  $c$  - концентрация оптически активного вещества [г/см<sup>3</sup>].

Для изотропной среды, содержащей  $N_1$  хиральных молекул в 1 см<sup>3</sup> получается

$$\varphi = \frac{16\pi^3 N_1 \beta}{\lambda^2} \cdot \frac{n^2 + 2}{3} l ,$$

где  $\lambda$  - длина волны;  $n$  - показатель преломления среды;  $\beta$  - константа, характеризующая оптическую активность.

Оптически активные вещества, как правило, имеют в своем составе **хиральный центр**, который представляет собой группировку атомов, не имеющую плоскости или центра симметрии. Наличие хирального центра в молекуле приводит к существованию двух конфигураций - **энантиомеров**, являющихся зеркальными отражениями одна другой. Энантиомеры не могут быть совмещены друг с другом в результате поворотов в пространстве и представляют собой различные вещества с близкими, но, тем не менее, различающимися свойствами.

Однако, присутствие хирального центра - не единственная причина, приводящая к оптической активности. В общем оптическая активность обусловлена тем, что электрические и магнитные дипольные моменты перехода между состояниями с различной энергией имеют различную ориентацию в пространстве. Таким образом, величина  $\beta$  может быть представлена как сумма следующих вкладов:

- 1) вклады отдельных групп, равные нулю, если группы нехиральны (например, группы **-CH<sub>3</sub>**);
- 2) вклад, являющийся результатом электростатического дипольного взаимодействия анизотропно поляризующихся групп в молекуле. Этот вклад определяется поляризуемостями атомных групп и непосредственно зависит от их взаимного геометрического расположения, т. е. от конфигурации и конформации молекулы, и обращается в нуль при наличии плоскости или центра симметрии;
- 3) вклады, которые появляются от нехиральных групп, если они находятся в асимметричном поле соседних атомов (например, пептидная связь **-NH-CO**, имеющая плоскую конфигурацию, в асимметричном поле приобретает хиральность);
- 4) вклад, возникающий в результате взаимодействия магнитного дипольного момента перехода  $\mathbf{m}_{j_0}$  одной группы с электрическим дипольным моментом перехода  $\mathbf{p}_{oj}$  другой группы.

Считается, что наиболее существенными являются второй и третий вклады. При этом изменение конформации молекулы влечет за собой изменение внутреннего электрического поля и в свою очередь изменяет  $\beta$ .

Хиральность биополимеров связана с хиральностью мономерных звеньев и хиральностью спиральной структуры. При денатурации сохраняется лишь хиральность мономеров. Можно выразить *среднее вращение мономера* как

$$m' = M_0 \frac{\varphi_{y\partial}}{100}, \quad (3)$$

где  $M_0$  - средняя молекулярная масса мономера. Учет влияния растворителя производится введением поправки Лоренца. Вместо  $m'$  применяется *приведенное среднее вращение мономера*:

$$\bar{m}' = \frac{3}{n^2 + 2} m' = \frac{3}{n^2 + 2} M_0 \frac{\varphi_{y\partial}}{100}. \quad (3a)$$

Для воды при  $20^\circ\text{C}$  множитель Лоренца  $3/(n^2+2)$  меняется от **0,7945** при **600 нм** до **0,7306** при **185 нм**.

В методе спектрополяриметрии производится регистрация зависимости угла вращения  $\varphi$  от длины волны  $\lambda$  - *дисперсии оптического вращения (ДОВ)*. Высокая чувствительность оптической активности к деталям молекулярной структуры позволяет применить метод спектрополяриметрии для изучения конформаций молекулярных структур, а с другой стороны по изменению оптической активности следить за процессами, связанными с конформационными перестройками.

Для более простых задач (например, определение концентрации оптически активного вещества) не требуется получение кривой ДОВ. В этих случаях вращение плоскости поляризации линейно поляризованного немонахроматического света или света с определенной длиной волны измеряют с помощью поляриметра. Оптическая схема такого прибора представлена на рис. 1.

Рис.1. Оптическая схема поляриметра

Прибор состоит из источника света 1, поляризатора 3, кюветы 4 с исследуемой жидкостью и анализатора 5. В приборе также применяются линзы 2 и окуляр 6 для наблюдения освещенности поля. В качестве поляризатора и анализатора используется призма Николя или Волластона. Поляризатор 3 пропускает световые волны строго одной поляризации, а именно - те, электрический вектор которых параллелен главной плоскости поляризации поляризатора. В свою очередь анализатор 5 предназначен для определения ориентации плоскости поляризации поляризованного света. Интенсивность света ( $I$ ), прошедшего через анализатор, определяется законом Малюса:

$$I = I_0 \cos^2 \varphi$$

$I_0$  - интенсивность поляризованного света, падающего на анализатор;

$\phi$  - угол между плоскостью поляризации падающего света и плоскостью анализатора.

Поворотом анализатора, механически связанного с лимбом отсчета угла, добиваются минимальной освещенности поля, которая получается при взаимно перпендикулярном расположении анализатора и плоскости поляризации света, прошедшего через образец. Угол оптического вращения соответствует углу поворота анализатора относительно взаимно скрещенного расположения поляризатора и анализатора. Для характеристики удельного угла вращения используется обозначение  $[\alpha]_{\lambda}^t$ , для которого всегда указывается при какой температуре  $t$  в  $^{\circ}\text{C}$  и на какой длине волны  $\lambda$  производится измерение, а сама величина удельного угла вращения определяется аналогично выражению (3а):

$$[\alpha]_{\lambda}^t = \phi / lc$$

где  $\phi$  - наблюдаемый угол вращения в градусах,

$l$  - длина кюветы [дм],

$c$  - объемная концентрация [г оптически активного вещества / $\text{см}^3$  раствора]; таким образом, удельное вращение численно равно увеличенному в 100 раз углу поворота плоскости поляризации слоем раствора толщиной 10 см при концентрации вещества 1 г на  $100 \text{ см}^3$  раствора.

Чаще всего измерение проводится при температуре  $20^{\circ}\text{C}$  на длине волны желтой линии натрия, соответствующей фраунгоферовой линии **D** спектра видимого света. Знак «+» соответствует правому вращению; знак «-» соответствует левому вращению.

Метод поляриметрии может применяться для изучения кинетики образования белково-углеводных комплексов (*гликопротеинов*) в результате ковалентного связывания белков и углеводов. В организме гликопротеины могут образовывать непрерывный слой толщиной 3 - 4 нм - *гликокаликс*, который отделяет клеточную поверхность от межклеточной среды. Кроме того гликопротеины являются важными компонентами сыворотки крови (иммуноглобулины, трансферины), веществами, определяющими групповую принадлежность крови, антигенами многих вирусов, гормонами и ферментами.

В молекулах гликопротеинов олиго- и полисахаридные остатки ковалентно связаны (**O**- и **N**- гликозидными связями) с полипептидными цепями.

В образовании **O**-гликозидной углевод-белковой связи участвуют гидроксиаминокислоты: известны комбинации галактоза (**Gal**) - гидроксизин, галактоза или арабиноза-гидроксипролин, но чаще в узле углевод-белковой связи находятся серин или треонин. Подавляющее большинство таких гликопротеинов содержит в узле углевод-белковой связи один и тот же дисахаридный фрагмент (так называемый *кор*, или стержень), который состоит из остатков галактозы и **N**-ацетилгалактозамина (**GalNAc**) и имеет строение **Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ 1**-(цифры обозначают номера атомов **C** в моносахаридах, участвующих в образовании гликозидных связей, греческие буквы - конфигурацию аномерного атома **C**). Кор связан с атомом **O** гидроксильной группы остатка серина или треонина:

В гликопротеинах, у которых углеводная и полипептидная цепи соединены N-гликозидными (гликозил-амидными) связями (N-гликозилпротеины), остаток N-ацетилглюкозамина связан с атомом N амидной группы остатка аспарагина в полипептидной цепи. В этом случае кор углеводной цепи гликопротеин-пентасахарид:

**Man $\alpha$ 1 6**

**> Man $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-**

**Man $\alpha$ 1 3**

Гликопротеины поверхности клеток ответственны за межклеточные взаимодействия и реакции клетки с внешней средой. Биологическая специфичность O-гликозилпротеинов находится обычно в зависимости от структуры углеводной компоненты молекулы. За биологическую специфичность N-гликозилпротеинов (иммуноглобулины, антигены вирусов) ответственна в основном белковая компонента молекулы, а углеводные цепи участвуют в основном в формировании и поддержании необходимой конформации молекулы. Полипептидная цепь N-гликозилпротеинов по составу аминокислот не отличается от обычных сывороточных белков.

Таким образом углеводы играют важную роль, связанную со специфичностью организмов. Причины этого, по-видимому, лежат в самой структуре углеводов, которые обладают огромным числом центров асимметрии, стереоизомеров и конформеров, что в свою очередь связано с их оптической активностью.

В организмах из сахаров чаще всего встречаются гексозы. Альдопептозы являются компонентами нуклеиновых кислот, а производные триоз и пентоз играют важную роль как промежуточные продукты обмена.

Химическая активность сахара при образовании комплексов с белками обусловлена функциональностью его альдегидной группы. Такие сахара как глюкозо-6-фосфат, галактоза, рибоза и глицеральдегид присутствуют в растворах в большей степени в открытоцепочечных конфигурациях и, следовательно, более реакционноспособны.

Поскольку глюкоза присутствует в растворах преимущественно как пиранозное кольцо хемиацетала, то из всех гексоз она наименее реакционноспособна. Неферментативная гликолизация (реакция глюкозы с белками) приводит к образованию *оснований Шиффа*  $R_1-N=CH-R_2$ . Это равновесная реакция, в которой количество шиффовых оснований определяется

законом действующих масс, т.е. *увеличение концентрации глюкозы ведет к увеличению концентрации оснований*. Глюкоза как и все простые сахара хорошо растворяется в полярных растворителях, в частности в воде, но не растворяется в неполярных.

В природе встречается только D-глюкоза, которая представлена в виде двух аномеров  $\alpha$ -D и  $\beta$ -D глюкопиранозы (ф-лы 1 и 2). Молекулы  $\alpha$ -D и  $\beta$ -D глюкопиранозы являются оптически активными.

$\alpha$ -D глюкопираноза обычно образуется в результате кристаллизации из воды и обладает удельным вращением  $[\alpha]_D^{20}=+112.2^\circ$ ;  $\beta$ -аномер кристаллизуется из других растворителей ( $[\alpha]_D^{20}=+18.9^\circ$  (водный раствор)). В водном растворе устанавливается динамическое равновесие между несколькими таутомерами (рис.2):  $\alpha$ - и  $\beta$ - формами D - глюкофуранозы (ф-лы 3 и 4) и D - глюкопиранозы, открытой альдегидной (5) и ее гидратной формы (6). Содержание  $\beta$ - и  $\alpha$ -глюкопираноз составляет около 64 и 36% соответственно, других таутомеров - менее 1%. Процесс установления равновесия между таутомерными формами, сопровождающийся изменением удельного вращения, называется *мутаротацией*.

### Рис.2. Таутомерные формы глюкозы

Изучение кинетики мутаротации для глюкозы показало, что она протекает как обратимая реакция, описываемая уравнением 1 порядка. Превращения такого типа, называют простой мутаротацией. Можно предположить, что простая мутаротация заключается в превращении одного аномера в другой без образования промежуточного продукта. Однако, ряд факторов позволяет считать, что простая мутаротация может протекать с образованием малого количества промежуточного продукта.

Наиболее предпочтительным механизмом мутаротации является механизм открытия кольца с образованием промежуточной альдегидной формы:

Открытие кольца является лимитирующей стадией, которая определяет скорость мутаротации. Мутаротация значительно ускоряется как кислотами, так и основаниями, причем последние действуют сильнее. Аналогично действие температуры. Очевидно образование белково-углеводных комплексов в растворе будет модифицировать простую мутаротацию, что можно фактически определить, изучая вращение плоскости поляризации света в течении определенного времени.

**Цель работы:** Изучить кинетику образования белково-углеводных комплексов методом поляриметрии.

**Необходимое оборудование, принадлежности и материалы:**

- сахариметр СУ-2, термостат УТ-15, колбы, пипетки;
- глюкоза, альбумин.

#### **Ход работы:**

Перед началом измерений с помощью юстировочного ключа установить поляриметр на нулевую точку (см. Приложение 3). В том случае, если это сделать не удастся, необходимо отметить начальное смещение  $\varphi_0$  шкалы, получив его как результат измерения  $\varphi$  для дистиллированной воды и в последующих измерениях учитывать  $\varphi_0$ . При измерении угла вращения при полутеневом методе фиксируется наступление в окуляре равномерной слабой освещенности соседних полей зрения (рис. 1, Б). Отсчет угла поворота производится следующим образом. Число целых градусов определяется на нижней шкале по ближайшему делению нижней шкалы, к нулю верхней шкалы. Десятые и сотые доли градуса соответствуют делению верхней шкалы (шкалы нониуса), положение которого точно совпадает с каким-либо штрихом нижней шкалы. Десятые и сотые доли градуса с учетом знака добавляются к целому числу отмеченных градусов.

При снятии показаний можно пользоваться методом "вилки". Метод "вилки" заключается в том, что сначала добиваются максимального контраста при затемненном левом поле и снимают показание  $\varphi_1$ ; затем добиваются максимального контраста при затемненном правом поле и снимают показание  $\varphi_2$ . В качестве угла вращения берут значение  $(\varphi_1 + \varphi_2)/2$ .

**Задание 1. Получение экспериментальных зависимостей  $\varphi(c)$  и  $\varphi(T)$  для растворов яичного альбумина.**

1. Приготовить ряд последовательных разбавлений растворов альбумина, начиная с концентрации  $10^{-7}$  моль/л,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$  и т.д.
2. Чистую сухую поляриметрическую кювету заполнить одним из приготовленных растворов. Убедившись в отсутствии пузырьков воздуха, поместить кювету в

поляриметр. Во избежание возникновения пузырьков воздуха в кювете ее необходимо заполнить до краев (чтобы жидкость образовывала выпуклый мениск), затем осторожно сбоку надвинуть покровное стекло и навинтить прижимное кольцо так, чтобы стекло было плотно прижато к торцу кюветы, и из нее не просачивался раствор. Снаружи кювету вытереть фильтровальной бумагой и поместить в желоб поляриметра как можно ближе к окуляру. Чтобы линия раздела полей сравнения была наиболее четкой, необходимо выбрать оптимальную ориентацию кюветы, вращая ее вокруг своей оси и подстроить окуляр на резкость с помощью накатанного кольца окуляра. Вращением ручки анализатора установить равномерное освещение поля зрения. По шкале с нониусом отсчитать и записать угол вращения. Взять среднее арифметическое **2-3** измерений. Снять концентрационную зависимость  $\varphi(c)$ .

**3.** Включить термостат, установив повышенную температуру. Заполнить поляриметрическую кювету раствором белка одной из приготовленных концентраций. После достижения установленной температуры выдержать в термостате **7-10 минут** кювету с образцом. Сразу после вынимания кюветы произвести измерение угла вращения. Увеличивая температуру термостата и периодически выдерживая в нем кювету с образцом, получить температурную зависимость  $\varphi(T)$  в интервале температур **20-80°C**.

**4.** Рассчитать удельное среднее вращение и вращение мономерного звена для яичного альбумина (м. вес альбумина **66.5 тыс.** на **585** аминокислотных остатков).

*Следует учесть, что в сахариметре применена международная сахарная шкала:  $100^\circ$  этой соответствуют  $34.62^\circ$  угловым (сахариметр показывает  $100^\circ$ , если на нем измеряют при температуре  $+20^\circ\text{C}$  в кювете длиной **2 дм** водный раствор сахарозы, содержащий **26 г** сахарозы в **100 см<sup>3</sup>** раствора).*

### **Задание 2. Изучение кинетики мутаротации.**

- 1.** Приготовить ряд навесок глюкозы (по **180 мг**).
- 2.** Налить в конусную колбу 20 мл дистиллированной воды и растворить в ней одну из навесок глюкозы. Чтобы ускорить растворение, необходимо производить взбалтывание колбы.
- 3.** Зафиксировать момент растворения глюкозы, отметив его по секундомеру как начало отсчета времени; как можно быстрее заполнить чистую сухую кювету и снять показание угла вращения.
- 4.** В течение первых **5 мин.** снимать показание через **каждую минуту**. В течении последующих **30 мин.** установить интервал между измерениями **5 мин.**, увеличив его до **10 мин.** к концу измерений. При этом общая продолжительность опыта должна составлять около **70 мин.**
- 5.** По результатам измерений рассчитать значения удельного вращения и сравнить с теоретическим ходом мутаротации.

### **Задание 3. Изучение влияния белка на ход мутаротации.**

- 1.** Примерно после **15-30 мин.** с момента начала измерений первого образца проделать операции указанные в пункте 2 (Зад.2), растворив вторую навеску глюкозы в растворе альбумина.
- 2.** Произвести измерения согласно пп. 3-4 (Зад.2).



3. Через некоторое время приготовить следующий образец и провести измерения и так далее.
4. Результаты представить на графике в виде временной зависимости удельного угла вращения исследуемых образцов за вычетом вклада, который дает белок.

#### КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ:

1. Описать механизм белково-углеводного взаимодействия.
2. Дать теоретическое представление кинетики мутаротации.
3. Объяснить причину изменения хода мутаротации в присутствии белка.

#### ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА:

1. Б.Н. Степаненко. Химия и биохимия углеводов. Политиздат. М. Наука. 1981.
2. Р. Хьюз. Гликопротеины. Мир. 1985.
3. Волькенштейн М.В. Биофизика. Наука. 1981.

#### Лабораторная работа № 9

### НАБЛЮДЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ В ЛЮМИНЕСЦЕНТНОМ МИКРОСКОПЕ

*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.*

Люминесцентная микроскопия по сравнению с другими видами микроскопии имеет ряд преимуществ:

- высокая чувствительность люминесцентной микроскопии по сравнению с обычной световой микроскопией;
- специфичность люминесценции веществ к физическим условиям среды и наличию химических агентов;
- хорошая яркость и контрастность изображений (при наблюдении по методу темного поля);
- широкое использование для изучения фиксированных, замороженных и живых клеток и тканей.

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 биологии и 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  $E_0$ , называемый **основным**, соответствует наименьшей энергии, которой может обладать отдельный атом или молекула. Уровни, соответствующие более высокой энергии, называются **возбужденными**. 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  $E_0$  на  $E_1$  энергия поглощенного кванта  $h\nu$  в точности равна разности между энергетическими уровнями  $E_1$  и  $E_0$  :

$$h\nu = E_1 - E_0$$

где  $h$  - постоянная Планка;

$\nu$  - частота электромагнитной волны.

Рис. 1. Схема электронных переходов между энергетическими уровнями.

В обычных условиях, как правило, молекула 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 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 же возбужденное состояние.

Поглощение фотона происходит за время порядка  $10^{-15}$  с, что соответствует периоду колебания световой волны. Находясь в возбужденном состоянии  $S_1$  в течение  $10^{-10} \div 10^{-8}$  с молекула может перейти в основное синглетное состояние без излучения, либо с излучением кванта света с вероятностями  $q$  или  $p$ , соответственно. Излучательный переход  $S_1 \rightarrow S_0$  называется **флуоресценцией**.

Согласно правилу Гунда ниже синглетного уровня  $S_1$  находится уровень энергии, соответствующий триплетному состоянию  $T_1$ . При переходе с синглетного на триплетный уровень электрон изменяет ориентацию своего

спина на противоположную, в результате чего суммарный спин оказывается равным единице. Мультиплетность такого состояния равна 3, и поэтому уровень, соответствующий такому состоянию, называется *триплетным*.

Излучательные переходы между состояниями разной мультиплетности, например, между синглетами и триплетами, теоретически запрещены. В действительности, вследствие спин-орбитального взаимодействия такие переходы наблюдаются, хотя они и менее вероятны, чем синглет-синглетные или триплет-триплетные переходы. Обычно уровни  $S_1$  и  $T_1$  расположены близко относительно друг друга, и поэтому имеется отличная от нуля вероятность безызлучательного перехода  $S_1 \rightarrow T_1$ .

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  $\pi$  и  $q_2$ , соответственно. Переход  $T_1 \rightarrow S_0$  также 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  $T_1$ . Излучательный переход  $T_1 \rightarrow S_0$  называется *фосфоресценцией*.

Молекула в триплетном состоянии легко теряет свою энергию в различных безызлучательных процессах при столкновении с окружающими молекулами. Поэтому фосфоресценция в жидких растворах при комнатной температуре наблюдается крайне редко. Как правило фосфоресценцию наблюдают в твердых телах при пониженных температурах.

Согласно правилу Стокса *длина волны люминесценции всегда больше длины волны возбуждающего света*. Объясняется это тем, что переход из возбужденного состояния осуществляется на колебательные подуровни основного состояния, имеющими несколько большую энергию, чем  $E_0$  и, следовательно, энергия излучаемого кванта будет меньше, чем поглощенного. Длина волны излучаемого света (цвет люминесценции) определяется химическим строением вещества и его физико-химическим состоянием. Отдельные вещества могут различаться между собой цветом люминесценции.

Интенсивность люминесценции при постоянной интенсивности возбуждающего света определяется *квантовым выходом* люминесценции - т.е. отношением числа излученных квантов к числу поглощенных квантов. Квантовый выход характеризует соотношение вероятностей излучательных и безызлучательных процессов и зависит от многих факторов: *природы вещества, растворителя, наличия примесей*, особенно тушителей люминесценции (**Os**, **Hg**, **I**), **pH** и *температуры среды*.

Оба процесса как флуоресценция так и фосфоресценция объединяются общим названием - *люминесценция*. В зависимости от природы внешнего источника энергии, вызывающего возбуждение молекулы различают *электролюминесценцию*, возбуждаемую электрическим током, проходящим через ионизированный газ или полупроводник; *радиолюминесценцию*, возникающую под действием частиц высокой энергии; *хемилюминесценцию*,

возникающую в результате химических реакций; **триболюминесценцию**, наблюдающуюся при разрушении некоторых кристаллов; **сонолюминесценцию**, возникающую при воздействии интенсивных звуковых волн на жидкость. Свечение, вызываемое действием видимого или ультрафиолетового света, носит название **фотолюминесценции**.

В люминесцентной микроскопии различают **первичную** и **вторичную** люминесценцию. **Первичная**, или **естественная**, люминесценция свойственна небольшой группе, веществ. Например, для хлорофилла типична ярко-красная, а 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 - **флуорохромов**. В качестве флуорохромов выступают обладающие флуоресценцией ароматические органические соединения (например, фенолы, амины). Флуорохромы 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**.

Среди флуорохромов широко применяются **катионный** флуорохром акридиновый оранжевый, молекула которого имеет положительно заряженную группу и **анионный** - уранин, несущий на себе отрицательный заряд.

### **Описание оптической системы люминесцентного микроскопа.**

Оптическая система люминесцентного микроскопа **МЛ-2** предусматривает возможность наблюдения объектов:

- а) *в проходящем свете*, т.е. при освещении объектов снизу через конденсор;
- б) *в свете люминесценции* при освещении объектов сверху через объектив;
- в) *при смешанном освещении*, т.е. при сочетании освещения сверху светом, возбуждающим люминесценцию, с одновременным освещением снизу по методу темного поля или фазового контраста;
- г) *в отраженном свете*.

Метод наблюдения выбирается самим исследователем в зависимости от характера задачи и вида объекта. Возможность освещения объектов сверху, через объектив, имеет преимущество перед освещением снизу, через конденсор - когда используются сильные объективы с большой апертурой ( $A=0,65\div 1,3$ ), так как при этом значительно повышается яркость изображения, когда исследуются толстые прозрачные и непрозрачные объекты.

Схема оптической системы микроскопа изображена на рис.2. Люминесцентный микроскоп построен по тому же принципу, что и обыкновенный световой микроскоп. В оптическую систему микроскопа введен более мощный источник ультрафиолетового или белого 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. Поскольку оптическая система микроскопа рассчитана на объективы при длине тубуса **190 мм**, то при использовании объективов, рассчитанных для тубуса **160 мм**, в ход лучей вводится корректирующая ахроматическая линза 8, которая дает дополнительное увеличение системы в **1,2 раза**.

Рис.2. Оптическая схема микроскопа МЛ-2.

**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, 16 и светоделительной пластинки 10 проецируется в выходной зрачок объектива. В свою очередь изображение полевой диафрагмы 17 проецируется линзами 15, 16, 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.

**При смешанном освещении** разделение светового пучка от источника света осуществляется светоделительной интерференционной пластинкой 20. Эта пластинка отражает сине-фиолетовые лучи в систему освещения сверху и пропускает желто-зеленые лучи в систему проходящего света (т.е. освещения снизу).

**При работе в отраженном свете** используется оптическая система освещения сверху, но вместо светоделительной пластинки 10 включают кольцевое зеркало 18 и диафрагму 19.

Для выделения из общего излучения определенных участков спектра используются светофильтры 21. 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 21 от нагрева ртутной лампой после коллекторной линзы устанавливается кювета 22, заполненная дистиллированной водой или слабым раствором медного купороса.

Возбуждающие лучи, после того как они прошли препарат и вызвали его свечение, необходимо убрать, иначе возбуждающий свет "забьет" свет люминесценции. Для этого в револьверном диске установлены "запирающие" светофильтры, параметры которых приведены в следующей таблице:

№ на диске	светофильтр*	интервал запираения	рекомендуемый светофильтр возбуждения
1	ЖС18(2мм)+ЖЗС19(1мм)	< 480 нм	ФС1, СС15
2	ЖС18(2мм)	-----"-----	-----"-----
3	+ЖЗС19(0,5мм)	340÷380нм	УФС6
4	ЖС3(2мм) ЖС3(3.5мм)	-----"-----	-----"-----

\* в скобках указана толщина стекла

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

**Необходимое оборудование, принадлежности и материалы:**

- люминесцентный микроскоп, предметные и покровные стеклянные палочки и пипетки;
- клеточная взвесь (дрожжи, эритроциты), раствор КСl (1,34 М), раствор акридинового оранжевого (1:10000), раствор уранина (1:10000).

**Ход работы:**

**Задание 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  $ТП \leftrightarrow Л$  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). При использовании иммерсионного объектива необходимо на готовые препараты нанести каплю иммерсионной жидкости (вода).

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. Квантово-механическое объяснение явления люминесценции.
2. Основные направления изучения люминесценции в биологических системах.
3. Чем обусловлена люминесценция белков и клеток?
4. Дать описание оптической системы люминесцентного микроскопа.

#### **ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА:**

1. Михайлов И.Ф., Дьяков Н.В., Люминесцентная микроскопия, М., Медгиз, 1961.

2. Владимиров Ю.А., Фотохимия и люминесценция белков, М., Наука, 1965.
3. Баренблейм Г.М., Доманский А.К., Туроверов К.К. Люминесценция биополимеров и клеток, М.-Л., Наука, 1966.
4. Кононенко К.И., Чайкина Л.А. Влияние ионов металлов на электрический заряд клеток. Биофизика. Т.15, №6, 1976.
5. Кононский А.И. Гистохимия. Киев, Высшая школа, 1976.

Лабораторная работа №10  
**ПРИМЕНЕНИЕ ИНТЕРФЕРЕНЦИОННОЙ МИКРОСКОПИИ ДЛЯ  
ИССЛЕДОВАНИЯ БИООБЪЕКТОВ.**

**Часть 1. ИЗМЕРЕНИЕ ТОЛЩИНЫ И ПОКАЗАТЕЛЯ ПРЕЛОМЛЕНИЯ  
ТОНКОЙ ПЛЕНКИ МЕТОДОМ ИНТЕРФЕРЕНЦИОННЫХ ПОЛОС.**

При помощи обыкновенного светового микроскопа можно наблюдать **амплитудные** объекты, детали которых в разной степени поглощают проходящий свет, и поэтому дают контрастное изображение. Однако, очень часто микрообъекты не проявляют никаких отличий в поглощении света. Так различные участки ткани (клетки, межклеточное вещество, волокна) и клетки (цитоплазма и ядро, плазмалемма и ядерная мембрана, эндоплазматическая сеть и органоиды) различаются между собой и окружающей средой только **показателем преломления** света. Световые лучи, проходя через эти образования, меняют скорость, что приводит к сдвигу фазы, невидимому при рассматривании препарата в обыкновенном световом микроскопе. Поэтому такие объекты получили название **фазовых**. Для лучшей видимости микроскопических структур препараты окрашивают (**фиксируют**). Но, к сожалению, фиксация материала вносит глубокие и необратимые изменения в прижизненное строение тканей и клеток.

Интерференционная микроскопия применяется для наблюдения как амплитудных так и фазовых микрообъектов, и т.о. может служить для выявления тканевых и клеточных структур на живом неокрашенном материале, позволяя получить их цветное контрастное изображение. Интерференционная микроскопия используется для определения толщины по разности оптического пути (фазового сдвига), для определения вида микроповерхности по градиенту разности оптического пути, для измерения показателя преломления, двойного лучепреломления, угла касания, содержания сухого вещества клетки, (в частности белка) и других количественных вычислений.

**Принцип действия интерференционного микроскопа с одной  
двупреломляющей призмой.**

В интерференционном микроскопе (рис.1) в отличие от обыкновенного светового микроскопа применяется **поляризационно-интерференционная система**, состоящая из **двупреломляющей призмы Волластона W**, **поляризатора P**, **анализатора A** и **щелевой диафрагмы S**. В призме Волластона, которая может перемещаться в горизонтальном и вертикальном направлениях, световой пучок



раздваивается на **обыкновенный** и **необыкновенный** лучи. Поляризатор и анализатор, которые могут вращаться вокруг вертикальной оси, представляют собой поляризационные фильтры, предназначенные для выделения света определенной поляризации.

Поляризационно-интерференционная система создает в проходящем свете ряд прямолинейных интерференционных полос, причем интенсивность этих полос будет максимальной, если направления плоскости поляризации поляризатора и анализатора **A** установлены параллельно или перпендикулярно друг другу и составляют угол  $45^{\circ}$  относительно преломляющей грани двупреломляющей призмы.

Расстояние **h** между полосами постоянное вдоль всей длины призмы и выражено формулой :

$$h = \frac{\lambda}{\varepsilon} \quad (1)$$

где  $\lambda$ - длина световой волны, [нм];

$\varepsilon$  - угол расхождения, [рад], величина которого зависит от угла  $\varphi$  двупреломляющей призмы.

Щелевая диафрагма **D** находится в фокусе конденсора **K**, причем щель **S** установлена параллельно преломляющей грани двупреломляющей призмы **W**. Щель **S** вместе с конденсором **K** составляют *коллиматор*, из которого выходят параллельные пучки когерентного света, интерферирующего в плоскости изображения микроскопа.

Интерференционные полосы в этой плоскости появляются только при соответственно суженной щели **S**, тогда как интерференционные полосы в выходном зрачке объектива **Ob**, упоминаемые выше, появляются при любой ширине щели.

Рис.1. Схема оптической системы поляризационно-интерференционного микроскопа с одной двупреломляющей призмой

$Z$  - источник света,  $Kol$  - коллектор,  $Dp$  - диафрагма поля,  $P$  - поляризатор,  $D$  - щелевая диафрагма,  $S$  - щель,  $K$  - конденсор,  $B$  - препарат,  $Ob$  - объектив,  $W_1$  - двупреломляющая призма,  $A$  - анализатор,  $ND$  - бинокулярная насадка,  $Ok$  - окуляр,  $MP$  - вспомогательный микроскоп,  $E$  - окуляр,  $L$  - объектив.

### Метод интерференционных полос.

Рассмотрим фазовый объект  $\mathbf{B}$  (рис.1), имеющий форму узкой полоски с толщиной  $\mathbf{d}$ . Пусть показатель преломления  $\mathbf{n}$  для  $\mathbf{B}$  отличается от коэффициента преломления  $\mathbf{n}_1$  для окружающей среды, так что  $\mathbf{n} > \mathbf{n}_1$ . Тогда плоская линейно поляризованная световая волна  $\Sigma_p$ , пройдя через объект  $\mathbf{B}$ , подвергается запаздыванию по фазе, принимая форму волны  $\Sigma$ . Эта волна попадает в объектив  $Ob$  и затем раздваивается двупреломляющей призмой на обыкновенную и необыкновенную волны, поляризованные во взаимно перпендикулярных плоскостях. Из этих волн анализатор  $A$  пропускает только те составляющие, которые являются параллельными его собственному направлению световых колебаний.

После прохождения через анализатор обыкновенная  $\Sigma_o'$  и необыкновенная  $\Sigma_e'$  волны будут линейно поляризованы параллельно друг другу. Эти волны могут интерферировать и в результате суперпозиции в плоскости изображения микроскопа появляется интерференционное изображение в виде прямолинейных интерференционных полос, искаженных в противоположных направлениях в месте появления обыкновенного  $\mathbf{B}_o'$  и необыкновенного  $\mathbf{B}_e'$  изображений объекта (рис.2). Такое изображение можно интерпретировать как наблюдение с помощью интерферометра двух предметов с оптической толщиной, соответственно,  $\mathbf{d}(\mathbf{n}_1 - \mathbf{n})$  и  $-\mathbf{d}(\mathbf{n}_1 - \mathbf{n})$ , раздвинутых на расстояние:

$$r = \frac{l \cdot \varepsilon}{g} \quad (2)$$

где  $l$  - расстоянием между точкой расхождения световых лучей и плоскостью изображения микроскопа ( $l = |CB'|$ , Рис.1),

$\varepsilon$  - угол расхождения, выраженный в радианах,

$g$  - увеличение объектива микроскопа.

Рис.2. Изображение узкой полосы в интерференционном поле полос:  $B_o'$  - обыкновенное изображение,  $B_e'$  - необыкновенное изображение,  $h'$  - межполосное расстояние,  $d$  - смещение интерференционных полос.

При скрещенных поляризаторе и анализаторе, темные полосы появляются в тех местах, где разность оптического пути между интерференционными волнами  $\Sigma_o'$  и  $\Sigma_e'$  равна нулю или равна полной кратности длины световой волны  $\lambda$ : при параллельных же поляризаторе и анализаторе темные полосы появляются в тех местах, где разность оптического пути между этими волнами равна нечетной кратности  $\lambda/2$ . В случае применения белого света при скрещенных поляризаторе и анализаторе интерференционные полосы окрашены за исключением нулевой полосы, причем по мере возрастания порядка интерференции они становятся все менее интенсивными и в конце концов исчезают.

Представленный выше метод, называемый **методом интерференционных полос**, применим для изучения небольших объектов, изображения которых могут быть раздвоены по крайней мере на **50%**. При этом, удлиненные предметы - волокна, тонкие полоски или грани рекомендуется устанавливать под углом около **45°** к направлению интерференционных полос (рис.2). Измеряя расстояние между полосами  $h'$  и смещение полос  $d$ , и зная показатель преломления  $n_1$  окружающей среды, можно определить либо показатель преломления  $n$  исследуемого объекта, если известна его толщина  $d$ ; либо толщину  $d$ , если известен показатель преломления  $n$ . Применяя две иммерсионные жидкости с известными показателями преломления  $n_1$  и  $n_2$  можно одновременно определить  $d$  и  $n$ .

**Цель работы:** Ознакомиться с устройством интерференционного микроскопа. Измерить разность оптического пути на тонкой пленке, определить ее толщину и показатель преломления методом интерференционных полос.

**Необходимое оборудование, принадлежности и материалы:**

- микроскоп POLAM, предметные и покровные стекла;
- образцы тонких пленок, глицерин.

**Ход работы:**

**З а д а н и е.** *Определение толщины и показателя преломления тонкой пленки.*

1. Подготовить микроскоп к работе (см. Приложение 5, разд.1).
2. Определить межполосное расстояние  $h$  для призмы с интерференционными полосами (**№2**) (см. Приложение 5, разд.2).
3. Определить постоянную двупреломляющей призмы  $P'$  (см. Приложение 5, разд.3).
4. Определить разность оптического пути  $\Phi$  для тонкой пленки.

Простой способ определения разности оптического пути  $\Phi$  заключается в измерении ширины межполосного расстояния  $h'$  в поле зрения и величины смещения  $d$  интерференционных полос в изображении исследуемого объекта (рис.2). Измерив величины  $h'$  и  $d$  и зная длину волны света  $\lambda$ , разность оптического пути  $\Phi$  определяется по формуле:

$$\Phi = \frac{d}{h'} \lambda \quad (3).$$

Для белого света лучше всего проводить измерение при помощи темной нулевой полосы или первой окрашенной полосы. При этом удобно производить отсчет удвоенной длины  $d$ , как расстояния между центрами одной и той же полосы в обыкновенном и необыкновенном изображении исследуемых объектов (рис.2). Для объектов с неоднородной разностью оптического пути измерение должно производиться в четко определенном локальном месте. В этом случае следует установить препарат таким образом, чтобы выбранному месту соответствовал центр смещенной полосы взятой для измерения.

Измерение межполосного расстояния  $h'$  и смещения полос  $d$  производится посредством окуляра  $12\times$  с микрометрической шкалой. Точность определения  $|\Phi|$  данным способом равна  $\sim \lambda/10$ .

Второй метод измерения разности оптического пути  $|\Phi|$ , дающий точность  $\sim \lambda/30$ , заключается в измерении величины смещения  $p = |p_2 - p_1|$  двупреломляющей призмы, которое необходимо произвести для максимального затемнения нулевой интерференционной полосой того же самого фрагмента в обоих отдельных изображениях исследуемого объекта. Этот метод подходит для измерения мелких объектов, дающих отдельные изображения. Удлиненные объекты при этом следует устанавливать параллельно направлению интерференционных полос.

Величина  $|\Phi|$  будет определяться следующими формулами:

$$|\Phi| = \begin{cases} \frac{\lambda}{2h} |p - p'| & n < n_1 \\ \frac{\lambda}{2h} |p + p'| & n > n_1 \end{cases} \quad (4)$$

где  $n$  - показатель преломления исследуемого объекта,

$n_1$  - показатель преломления окружающей среды,

$\lambda$  - длина волны света,

$h$  и  $p'$  - постоянные двупреломляющей призмы.

5. Подготовить препарат тонкой пленки в виде узкой полоски и сориентировать его, вращая столик, под углом около  $45^\circ$  к направлению интерференционных полос.

6. Установить является ли показатель преломления исследуемого объекта больше или меньше показателя преломления окружающей среды  $n_1$ . Для этого, перемещая двупреломляющую призму, наблюдаем, с какой стороны темной полосы нулевого порядка интерференции получается затемнение одного или другого изображения исследуемого объекта. Если левое изображение затемняется с правой стороны этой полосы, а правое изображение с левой, то  $n > n_1$  - и,

наоборот, если левое изображение затемняется с левой стороны нулевой темной полосы, а правое изображение с правой стороны этой полосы, то  $n < n_1$ .

7. Определить по соответствующей формуле значение  $|\Phi|$ .

8. Заполнить воздушный промежуток имерсионной жидкостью (например, водой) с известным показателем преломления и произвести измерения разницы оптического пути  $|\Phi_2|$  относительно этой среды.

9. Определить показатель преломления  $n$  и толщину  $d$  пленки по формулам:

$$n = \frac{\Phi_1 n_2 - \Phi_2 n_1}{\Phi_1 - \Phi_2} \quad (5)$$

$$d = \frac{\Phi_1 - \Phi_2}{n_1 - n_2} \quad (6)$$

беря  $\Phi_i$  со знаком «+» ( $\Phi_i = |\Phi_i|$ ), если  $n < n_i$  и со знаком «-» ( $\Phi_i = -|\Phi_i|$ ), если  $n > n_i$ .

## Часть 2. ИЗУЧЕНИЕ ЭРИТРОЦИТОВ МЕТОДОМ ОДНОРОДНОГО ПОЛЯ С БОЛЬШИМ РАЗДВОЕНИЕМ ИЗОБРАЖЕНИЯ.

### Метод однородного поля с большим раздвоением изображения.

Интерференционное изображение полос в плоскости изображения микроскопа получается только тогда, когда плоскость локализации интерференционных полос двупреломляющей призмы  $W$  не совпадает с фокусом  $F_{об}'$  объектива  $Ob$  микроскопа (рис.1). Если двупреломляющую призму будем приближать к объективу, то интерференционные полосы в плоскости изображения микроскопа все более расширяются и, наконец, когда точка раздела световых лучей точно совпадает с фокусом  $F_{об}'$  объектива получается однородное поле. В этом случае, фронтальные поверхности волн  $\Sigma_o'$  и  $\Sigma_e'$  не пересекаются и не наклонны относительно друг друга, как это имеет место в методе интерференционных полос, а являются параллельными друг другу (рис.3). Разность оптического пути  $\psi$  за пределами области, где появляются раздвоенные изображения  $B_o'$  и  $B_e'$  объекта  $B$ , в этом случае не изменяется непрерывно, а является постоянной величиной. В результате, фон поля зрения микроскопа представлен в виде

Рис.3.

однородного цвета, а наблюдаемый объект в виде изменения этого цвета в месте появления раздвоенных изображений  $B_o'$  и  $B_e'$  или изменения яркости монохроматического света. Яркость поля зрения зависит при этом от разности оптического пути  $\psi$  между волнами  $\Sigma_o'$  и  $\Sigma_e'$ . При скрещенных поляризаторе и анализаторе, фон поля зрения будет максимально темным, если  $\psi$  равна нулю или

полной кратности длины  $\lambda$  световой волны. В том случае, если  $\psi$  равна нечетной кратности  $\lambda/2$  поле зрения будет максимально светлым. Для промежуточных значений яркость поля будет соответственно изменяться.

При параллельно установленных поляризаторе и анализаторе ситуация меняется: минимальное затемнение поля зрения получаем для  $\psi=m\lambda$  ( $m=0,1,2\dots$ ), а максимальное для  $\psi=m\lambda/2$  ( $m=1,3,5$ ). При применении белого света вместе с изменением разности оптического пути  $\psi$  происходит изменение цвета.

Интерференционные цвета для разных оптических путей  $\psi$ , как при скрещивающихся так и при параллельных поляризаторе и анализаторе, приведены в табл.1. Так, например, для  $\psi=0$ , в случае скрещенных поляризатора и анализатора, получаем темный цвет, который затем по мере возрастания  $\psi$  переходит в серый цвет, белый цвет и в различные оттенки желтого и красного цветов. При  $\psi=565\text{нм}$  появляется так называемый чувствительный цвет первого интерференционного порядка. Это пурпурный цвет, характеризующийся тем, что быстро переходит в красный или фиолетовый цвет, если разность оптического пути  $\psi$  подвергается незначительному изменению. Таким образом, получаем большой скачок цвета, при незначительном изменении разности оптического пути. В случае параллельной установки поляризатора и анализатора, чувствительный цвет первого порядка появляется при  $\psi=280\text{нм}$ .

Значение разности оптического пути  $\psi$ , между интерферирующими волнами  $\Sigma_o'$  и  $\Sigma_e'$  зависит от того, в каком месте двупреломляющей призмы  $W$  (рис.1) проходит свет. Передвигая эту призму в горизонтальном направлении, можно лишь изменять разность оптического пути  $\psi$  и тем самым яркость или цвет фона поля зрения микроскопа и изображений наблюдаемых объектов. Это дает возможность соответственного подбора условий наблюдения объекта в цветном интерференционном контрасте, а также делает возможным выполнение измерения разности оптического пути  $\Phi$ . Рассмотрим это более подробно.

Предположим, что наблюдение производится в белом свете и при этом двупреломляющая призма установлена на чувствительный цвет первого порядка ( поляризатор и анализатор скрещены). В таком случае фон поля зрения микроскопа ( зона a, b, c на рис.3) будет пурпурным. В местах, где появляется обыкновенное  $B_o'$  и необыкновенное  $B_e'$  изображение рассматриваемого объекта  $B$ , цвет будет иной, потому что в  $B_o'$  разность оптического пути  $\psi$  между интерферирующими волнами  $\Sigma_o'$  и  $\Sigma_e'$  является меньшей, а в  $B_e'$  - большей на величину разности оптического пути  $\Phi$ , так что для  $B_o'$   $\psi=(560-\Phi)\text{нм}$ , а для  $B_e'$   $\psi=(560+\Phi)\text{нм}$ .

Пусть, например,  $\Phi=100\text{нм}$ , тогда в  $B_o'$  разность оптического пути  $\psi=460\text{нм}$ , а в  $B_e'$   $\psi=660\text{нм}$ . Как видно из таблицы интерференционных цветов изображение  $B_o'$  будет окрашено в оранжевый цвет, а изображение  $B_e'$  в голубой. Для  $\psi=0$  (при скрещенных поляроидах), т.е. при установке двупреломляющей призмы на темный цвет, оба изображения будут окрашены одинаково в лавандово-серый цвет. При установке двупреломляющей призмы на другой цвет фона поля зрения, раздвоенные изображения принимают иной цвет.

Следовательно, устанавливая двупреломляющую призму на разные цвета фона поля зрения и оценивая изменение цвета в раздвоенных изображениях исследуемого объекта можно затем определить разность оптического пути  $\Phi$  этого объекта по отношению к окружающей среде.

Вышеописанный метод во многих случаях может давать хорошие результаты, однако, в некоторой степени является субъективным. Поэтому применяют более объективный метод измерения разности оптического пути, который в то же время прост в употреблении и гарантирует большую точность измерений. Он состоит в том, чтобы довести окраску обыкновенного изображения, или необыкновенного изображения, до исходной (эталонной) окраски фона поля зрения и одновременно измерять горизонтальное смещение двупреломляющей призмы. Для этого лучше всего употреблять темный цвет нулевого порядка интерференции (при скрещенных поляризаторе и анализаторе). Более наглядно поясняет это рис.4. Величиной, которую мы желаем измерить, является разность оптического пути  $\Phi$ , вызванная наблюдаемым объектом. Допустим, что двупреломляющая призма сначала установлена на темный фон поля зрения (рис.5а). Пусть этой установке отвечает  $p_0$  двупреломляющей призмы. При перемещении двупреломляющей призмы в горизонтальном направлении относительно положения  $p_0$ , в одном или другом направлении, поверхности волн раздвигаются, причем либо обыкновенная волна  $\Sigma_o'$  опережает по фазе необыкновенную волну  $\Sigma_e'$ , либо необыкновенная волна  $\Sigma_e'$  опережает по фазе обыкновенную волну  $\Sigma_o'$ . Когда разность оптического пути  $\psi$  между волнами  $\Sigma_o'$  и  $\Sigma_e'$  за пределами  $B_o'$  и  $B_e'$  становится равной разности оптического пути  $\Phi$ , вызванной объектом, то либо обыкновенное изображение  $B_o'$  (рис.4b) либо необыкновенное изображение  $B_e'$  (рис.4c) принимают темный цвет, т.е. такой цвет, какой имел фон поля зрения. Пусть установке на максимальное затемнение одного или второго изображения отвечает положение  $p_1$  двупреломляющей призмы. Тогда, разность оптического пути  $\Phi$  будет равна:

$$\Phi = |p_1 - p_0| \psi_p \quad (7)$$

где  $\psi$  разность оптического пути между волнами  $\Sigma_o'$  и  $\Sigma_e'$ , соответствующая смещению двупреломляющей призмы.

Легко убедиться в том, что

$$\psi = \lambda/h \quad (8)$$

Производя отсчет положения  $p_1$  и  $p_2$  призмы, при которых одно, а затем второе изображение исследуемого объекта принимают максимально темный цвет, определяем двойное значение  $\Phi$ :

$$2\Phi = |p_2 - p_1| \quad (9)$$

что увеличивает точность измерения.

#### Рис.4

В случае исследования объектов с изменяющейся толщиной или с изменяющимся показателем преломления, разность оптического пути  $\Psi$  в зонах раздвоенных изображений не является постоянной, а изменяется (рис.5). В связи с этим будет соответственно изменяться цвет или яркость отдельных мест изображения. По изменению цвета можно судить об изменении разности оптического пути в объекте или наоборот, затемняя отдельные части изображения, можно определить разность оптического пути в каждой точке исследуемого объекта.

#### Рис.5

До сих пор рассматривался только случай полного раздвоения обоих (обыкновенного и необыкновенного) изображений исследуемого объекта. Ситуация несколько меняется, когда изображения частично перекрываются (рис.6). Разница заключается в том, что в зоне совпадения изображений отсутствует изменение цвета (или яркости фона поля зрения), если исследуемый предмет изотропный и оптически однородный. Окраска фона поля зрения, где изображения  $B_o'$  и  $B_e'$  перекрываются (зоны а, с, е), одинаковая, потому что разность оптического пути  $\Psi$  на этих участках одинакова.

#### Рис.6

Цвет изменяется только в области b и d, где изображения раздвоены. Условия в этих областях те же что и в случае полного раздвоения, и только здесь можно производить измерение разности оптического пути  $\Psi$ , вызванной исследуемым объектом. Представленный выше метод, называемый **методом однородного поля с большим раздвоением изображения**, применим для исследования отдельных объектов (клеток, бактерий небольших микроорганизмов), тонких однородных слоев и пленок, мелких кристаллов и пр.

**Цель работы:** Исследовать эритроциты методом однородного поля с большим раздвоением изображения. Определить содержание сухого вещества клеток.

**Необходимое оборудование, принадлежности и материалы:**

- микроскоп POLAM, предметные и покровные стекла;
- эритроциты, физраствор, глицерин.



### Х о д р а б о т ы:

1. Подготовить микроскоп к работе по методу однородного поля с большим раздвоением изображения (см. Приложение 5, разд.4).

2. Определить межполосное расстояние  $h$  для призмы однородного поля с большим раздвоением изображения (№3) (см. Приложение 5, разд.5).

3. Измерить разность оптического пути  $|\Phi|$  эритроцитов по отношению к воздуху.

3.1. Приготовить мазок эритроцитов на предметном стекле.

3.2. Покрыть препарат покровным стеклом и произвести измерение  $|\Phi|$ . Измерение разности оптического пути производится следующим образом:

а) Установить двупреломляющую призму в нулевое положение  $p_0$ , для которого получается максимальное затемнение фона поля зрения микроскопа (рис.7).

б) Передвигая призму в горизонтальном направлении, произвести отсчет по шкале микрометра положения  $p_1$  или  $p_2$ , для которых максимально затемняется одно из раздвоенных изображение клетки (рис.7). Разность оптического пути определяется по формуле:

$$\Phi = |p_i - p_0| \frac{\lambda}{h} \quad i = 1, 2 \quad (10)$$

Если оба изображения исследуемого объекта разделены или разделены неполностью, но объект оптически однороден и имеет постоянную толщину  $d$ , то разность оптического пути определяется разностью положений  $p_1$  и  $p_2$ :

$$\Phi = |p_2 - p_1| \frac{\lambda}{2h} \quad (11)$$

В случае, если разность оптического пути  $\Phi$  исследуемого объекта меньше длины световой волны  $\lambda$  ( $\Phi < \lambda$ ), то производится уравнивание яркости сначала одного, а затем другого изображений

Рис.7. Измерение разности оптического пути в однородном поле.

с яркостью фона поля зрения. В этом случае разность оптического пути  $\Phi$  выражается формулой:

$$\Phi = |p_2 - p_1| \frac{\lambda}{h} \quad (12)$$

где  $|p_2 - p_1|$  - расстояние между двумя ближайшими положениями призмы, для которых одно и другое изображение становится невидимым. Если в поле зрения микроскопа находится только одно из изображений, то разность пути  $\Phi$  вычисляется по формуле:

$$\Phi = 2|p_0 - p_1| \frac{\lambda}{h} \quad (13)$$

где  $p_0$  соответствует установке призмы на максимально темный фон, а  $p_1$  - установке, при которой яркость изображения и фона одинаковы. Использование метода выравнивания яркости более предпочтительно по сравнению с установкой на максимальное затемнение, поскольку человеческий глаз более восприимчив к сравнительному анализу яркости смежных областей в поле зрения микроскопа, чем к определению минимальной яркости. При этом точность измерений  $\Phi$  в лучшем случае может достигать величины  $\sim \lambda/80$ .

Однако, метод, заключающийся в уравнивании яркости одного, а затем второго изображения с яркостью фона поля зрения может применяться только для очень тонких однородных объектов, в то время как для биологических объектов, обладающих оптической неоднородностью, может применяться первый метод.

в) Произвести измерение  $\Phi$  для **5-10** различных клеток и определить среднее значение.

г) Определить соотношение показателей преломления клеток к окружающей среде.

Если при передвижении двупреломляющей призмы в горизонтальном направлении последовательность затемнения изображений темным цветом нулевого порядка интерференции соответствует направлению передвижения двупреломляющей призмы, то показатель преломления  $n$  исследуемого объекта больше показателя преломления  $n_1$  окружающей среды ( $n > n_1$ ) - и наоборот, если последовательность затемнения изображений этим цветом обратна направлению передвижения призмы, то  $n < n_1$ . Если  $n < n_1$ , то необходимо брать  $\Phi$  со знаком "+", а если  $n > n_1$  со знаком "-".

#### 4. Определить содержание сухого вещества клетки.

Биологическую клетку можно рассматривать как однородную пластинку с толщиной  $d$ , погруженную в водную среду. В таком случае, разность оптического пути  $\Phi$  света, проходящего через клетку относительно окружающей среды равна

$$\Phi_w = (n_w - n)d \quad (14)$$

где  $n$  - показатель преломления внутриклеточного вещества,

$n_w$  - показатель преломления воды.

С другой стороны между показателем преломления  $n_w$  растворителя (в данном случае воды) и концентрацией сухого вещества в клетке существует связь

$$n - n_w = \delta c, \quad (15)$$

где  $\delta$  - удельный инкремент показателя преломления (для большинства биологических веществ равен **0,0018**).

Считая, что объем клетки равен произведению  $A \cdot d$  (где  $A$  - площадь проекции клетки в плоскости наблюдения), то количество сухого вещества определяется как

$$m = 0.01 A \cdot d \cdot c \quad (16)$$

Во многих случаях, особенно при сравнительных исследованиях, достаточно знать количество сухих веществ, приходящихся на единицу поверхности:

$$m' = m/A \quad (17)$$

Из формул (14) - (16) легко получается выражение для  $m'$ :

$$m' = \frac{\Phi_w}{100 \delta} \quad (18)$$

Тогда определение  $m'$  сводится к измерению разности оптического пути  $\Phi_w$ .

В случае, если исследуемый биологический объект является в большей степени неоднородным и в разных местах дает разные фазовые смещения, то полное содержание сухих веществ вычисляется путем суммирования парциальных содержаний в отдельных фрагментах, которые можно считать однородными.

4.1. Приготовить отмытую на физиологическом растворе взвесь эритроцитов. Каплю взвеси поместить на предметное стекло, покрыть покровным стеклом. Установить препарат на предметном столике микроскопа.

4.2. Измерить разность оптического пути  $\Phi_w$  для эритроцитов относительно физиологического раствора методом однородного поля с большим раздвоением изображения.

4.3. По формуле (18) рассчитать значение  $m'$ .

4.4. Используя данные, полученные при изучении эритроцитов относительно воздуха и водного окружения по формулам (5), (6) определить показатель преломления  $n$  эритроцитов и их толщину  $d$ .

4.5. По формуле  $c = m'/d$  рассчитать концентрацию  $c$  [г/мл] сухих веществ находящихся в клетке.

#### КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ:

1. Что понимают под интерференцией, поляризацией и двулучепреломлением света?
2. Какие объекты называют фазовыми, а какие амплитудными?
3. Что такое оптическая длина пути?
4. Каким образом формируется изображение объекта в методе интерференционных полос?
5. Каким образом формируется изображение объекта в методе однородного поля с большим раздвоением изображения?

Таблица 1.

#### Интерференционные цвета для разностей оптического пути между обыкновенной и необыкновенной волной

Разность оптического пути в нм	Скрещенные поляризатор и анализатор	Параллельные поляризатор и анализатор
00	черный	белый
40	металло-серый	белый
97	лавандово-серый	желтовато-белый
158	серо-синий	желтовато-бледный
218	серо-светлейший	желто-коричневый
234	зеленовато-белый	бурый
259	белый	красно-светлый
267	желтовато-белый	красно-карминовый
275	соломенно-бледный	красно-коричневый
281	соломенно-желтый	темно-фиолетовый

306	светло-желтый	индиго
332	желто-живой	голубой
430	коричнево-желтый	серо-голубой
505	красно-оранжевый	голубовато-зеленый
536	красный теплый	бледно-зеленый
551	темно-красный	желтовато-зеленый
565	пурпурный	зеленый светлый
575	фиолетовый	зеленовато желтый
589	индиго	золотисто-желтый
664	голубой (как небо)	оранжевый
728	голубой	коричнево-оранжевый
747	зеленовато-зеленый	красно-карминовый
826	светло-зеленый	светло-пурпурный
843	желтовато-зеленый	фиолетово-пурпурный
866	зеленовато-желтый	фиолетовый
910	желтый чистый	индиго
948	оранжевый живой	темно-голубой
998	оранжево-красный	зеленовато-голубой
1101	красный темный	зеленый
1128	фиолетово-голубой светлый	желтовато-зеленый
1151	индиго	желто-коричневый
1258	голубой с зеленоватым оттенком	телесный
1334	зеленый морской	коричнево-красный
1376	ярко-зеленый	фиолетовый

## СОДЕРЖАНИЕ

	стр.
ПРЕДИСЛОВИЕ	3
ВВЕДЕНИЕ	
1. ИЗУЧЕНИЕ ФОТОДИНАМИЧЕСКОГО ГЕМОЛИЗА ЭРИТРОЦИТОВ	3
2. МЕТОД КИСЛОТНЫХ ЭРИТРОГРАММ. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ЭРИТРОЦИТОВ ПО СТОЙКОСТИ.	7
3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОНИЦАЕМОСТИ ЭРИТРОЦИТОВ ДЛЯ ИОНОВ КАЛИЯ МЕТОДОМ ПЛАМЕННОЙ ФОТОМЕТРИИ.	11
4. ИЗУЧЕНИЕ ЯВЛЕНИЯ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА ДРОЖЖЕВЫХ КЛЕТОК	
5. ЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БИОЛОГИЧЕСКИХ ТКАНЕЙ	15
6. ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ УЛЬТРАФИОЛЕТОВОГО ОБЛУЧЕНИЯ НА ПОВЕРХНОСТНОЕ НАТЯЖЕНИЕ	

ЛИПИДНЫХ ПЛЕНОК	19
7. ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОГО ВЕСА ИЗОПИЕСТИЧЕСКИМ МЕТОДОМ	
8. ИЗУЧЕНИЕ КИНЕТИКИ ОБРАЗОВАНИЯ БЕЛКОВО- УГЛЕВОДНЫХ КОМПЛЕКСОВ МЕТОДОМ ПОЛЯРИМЕТРИИ.	25
9. НАБЛЮДЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ В ЛЮМИНЕСЦЕНТНОМ МИКРОСКОПЕ	36
10. ПРИМЕНЕНИЕ ИНТЕРФЕРЕНЦИОННОЙ МИКРОСКОПИИ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ БИООБЪЕКТОВ.	42
	48
	56
	63