

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І. І. МЕЧНИКОВА
Біологічний факультет
Кафедра біохімії



**МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ ДО ВИКОНАННЯ
ЛАБОРАТОРНИХ РОБІТ З КУРСУ БІОФІЗИКА**

для здобувачів вищої освіти спеціальностей **091** «Біологія»,
162 «Біотехнології і біоінженерія»

ОДЕСА
2022

УДК 577.3.(075.8)
M545

Рецензенти:

К. Й. Черничко, кандидат біологічних наук, доцент кафедри зоології Одеського національного університету імені І. І. Мечникова;

І. Л. Рижко, кандидат біологічних наук, доцент кафедри гідробіології та загальної екології Одеського національного університету імені І. І. Мечникова.

*Рекомендовано до друку Вченою Радою біологічного факультету
ОНУ імені І. І. Мечникова
Протокол № 1 від 05.09.2022 р.*

M545 Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт з курсу «Біофізика» для здобувачів вищої освіти спеціальностей **091** «Біологія», **162** «Біотехнології і біоінженерія» [електронний ресурс] / А.В. Сорокін, О.К. Будняк, С.С. Чернадчук, Н.Л. Федорко, О.В. Запорожченко, О.М. Андрієвський, С.А. Петров. – Одеса, 2022. – 96 с.

У методичних вказівках розглянуті питання з біофізики клітини, мембран, нуклеїнових кислот та ін. Для ефективного виконання лабораторних робіт у кожному розділі подається теоретичний огляд і пояснення щодо виконання робіт.

Для здобувачів біологічних спеціальностей університетів.

УДК 577.3.(075.8)

© А.В. Сорокін, О.К. Будняк, С.С. Чернадчук, Н.Л. Федорко, О. В. Запорожченко, О.М. Андрієвський, С.А. Петров, 2022

ЗМІСТ

	<i>стор.</i>
ВСТУП	5
КОРОТКА ІНСТРУКЦІЯ З ТЕХНІКИ БЕЗПЕКИ ПРИ РОБОТІ В БІОФІЗИЧНІЙ ЛАБОРАТОРІЇ	5
ЗМІСТОВИЙ МОДУЛЬ І. ОСНОВИ ТЕОРІЇ ІНФОРМАЦІЇ, ТЕРМОДИНАМІКИ ТА КІНЕТИКИ БІОЛОГІЧНИХ ПРОЦЕСІВ	8
<i>КІНЕТИКА БІОЛОГІЧНИХ ПРОЦЕСІВ</i>	8
Лабораторна робота № 1. Визначення впливу концентрацій ферменту, субстрату та часу реакції на швидкість гідролізу білка. Визначення константи Міхаеліса.	13
Лабораторна робота № 2. Вивчення кінетики транспорту рибофлавіну в еритроцитах крові	18
Лабораторна робота № 3. Визначення температурного коефіцієнту та енергії активації скорочень ізольованого серця жаби	19
ЗМІСТОВИЙ МОДУЛЬ ІІ. БІОФІЗИКА КЛІТИНИ, БІОФІЗИКА МЕМБРАННИХ ПРОЦЕСІВ, БІОЕЛЕКТРИЧНІ ЯВИЩА	23
<i>ПРОНИКНІСТЬ КЛІТИН ТА ТКАНИН. НАБРЯКАННЯ ТКАНИН</i>	23
Лабораторна робота № 4. Дослідження проникності та набрякання тканин жаби	28
<i>БІОФІЗИКА БІОМЕМБРАН</i>	34
Лабораторна робота № 5. Вивчення стабільності біомембран	34
<i>ТЕРМОДИНАМІКА БІОЛОГІЧНИХ ПРОЦЕСІВ. ВИЗНАЧЕННЯ СТАНДАРТНОЇ ВІЛЬНОЇ ЕНЕРГІЇ</i>	41
Лабораторна робота № 6. Визначення константи рівноваги і стандартної вільної енергії за константою рівноваги	43
<i>МІГРАЦІЯ ЕНЕРГІЇ В БІОЛОГІЧНИХ СИСТЕМАХ</i>	47
Лабораторна робота № 7. Дослідження гемолізу еритроцитів за дії освітлення в присутності еритрозина	47
Лабораторна робота № 8. Вплив антиоксидантів на фотодинамічний гемоліз еритроцитів	49

ЗМІСТОВИЙ МОДУЛЬ ІІІ. КВАНТОВА ТА МОЛЕКУЛЯРНА БІОФІЗИКА

	51
<i>МОЛЕКУЛЯРНА БІОФІЗИКА. СПЕКТРИ ПОГЛИНАННЯ БІЛКІВ І НУКЛЕЇНОВИХ КИСЛОТ</i>	51
Лабораторна робота № 9. Визначення спектрів поглинання амінокислот, білків і нуклеїнових кислот	56
<i>БІОЕЛЕКТРИЧНІ ПОТЕНЦІАЛИ</i>	61
Лабораторна робота № 10. Визначення потенціалів різного походження	61
	66
<i>ЕЛЕКТРОКІНЕТИЧНІ ЯВИЩА</i>	
Лабораторна робота № 11. Визначення ξ -потенціалу дріжджових клітин	66
<i>ВИВЧЕННЯ ЕЛЕКТРОПРОВІДНОСТІ БІОЛОГІЧНИХ ОБ'ЄКТІВ</i>	71
Лабораторна робота № 12. Вимір опору біологічних об'єктів компенсаційним методом	72
<i>БІОФІЗИКА СКЛАДНИХ БІОЛОГІЧНИХ СИСТЕМ. МАТЕМАТИЧНЕ МОДЕЛЮВАННЯ СКЛАДНИХ БІОЛОГІЧНИХ СИСТЕМ</i>	75
Лабораторна робота № 13. Модель природного зростання чисельності популяції (за моделями Мальтуса та Вольтерра)	76
<i>ІОНІЗУЮЧІ ВИПРОМІНЮВАННЯ. ВИЗНАЧЕННЯ ФОНУ</i>	82
Лабораторна робота № 14. Визначення фону	83
Орієнтовні тести для самоконтролю	86
Література	95

ВСТУП

Біофізика вивчає фізичні властивості та явища в біологічних системах і фізико-хімічні основи процесів життєдіяльності організму. Біофізика також вивчає первинні механізми дії на організм різних фізичних факторів.

До методичних вказівок включені описи робіт з біофізики, що дозволяють отримати наукову інформацію про головні біофізичні властивості біооб'єктів. При складанні вказівок автори використовували досвід проведення лабораторних занять з біофізики на протязі чотирьох десятиліть. Для полегшення інтерпретації отриманих експериментальних даних автори вважали за доцільне дати короткі теоретичні довідки з основних розділів біофізики. Для прискорення збирання вимірювальних схем, монтажу установок, приладів та ін. у вказівках приведені відповідні ілюстрації. З метою контролю засвоєння студентами теоретичного матеріалу з досліджуваної теми наведені контрольні питання відповідно до програми з біофізики для класичних університетів.

Здобувачі усіх форм навчання, які виконують лабораторну роботу, повинні ретельно перевірити розрахунки, виразити їх у відповідних одиницях виміру, зробити висновки і дати на підпис викладачеві оформлений протокол.

До кожного наступного лабораторного заняття здобувачі повинні підготувати теоретичний розділ, зазначений у відповідній роботі.

Здобувачі, які не виконали вказані вимоги, до лабораторної роботи не допускаються.

КОРОТКА ІНСТРУКЦІЯ

з техніки безпеки при роботі в біофізичній лабораторії

Хімічні речовини при невмілому і неправильному використанні можуть стати причиною отруєння осіб, які працюють, викликати пожежу, вибух чи хімічний опік.

З метою виключення випадків травматизму при роботах у хімічних лабораторіях необхідно виконувати наступні вимоги:

1. Кожен здобувач до початку дослідження повинен добре ознайомитися з властивостями речовин, з якими прийдеться стикатися, і необхідними умовами безпечного проведення роботи з урахуванням можливих побічних реакцій.
2. При роботі у витяжній шафі, з метою більш ефективної дії вентиляції, слід підняти дверцята витяжної шафи на $\frac{1}{3}$ - $\frac{1}{4}$ її підйому. Після закінчення роботи необхідно щільно прикрити дверцята шафи.

3. У випадку перерви дії вентиляції всі роботи у витяжних шафах, які пов'язані з виділенням шкідливих газів, парів, треба негайно припинити.
4. Не залишати ніяких речовин у посуді без етикеток. Не робити ніяких дослідів у нечистому посуді.
5. Не залишати включених нагрівальних приладів, пальників, що горять, відкритих газових і водопровідних кранів.

ЗАПОБІЖНІ ЗАХОДИ ПРИ РОБОТІ З ЇДКИМИ РЕЧОВИНАМИ

1. При змішуванні концентрованих сірчаної й азотної кислот користатися тільки тонкостінним хімічним чи фарфоровим (порцеляновим) посудом.
2. Щоб уникнути розбризкування при розведенні концентрованої сірчаної кислоти – приливати кислоту у воду, а не навпаки.
3. При попаданні кислот чи лугів на поверхню шкіри їх варто негайно змити сильним струменем води.
4. Їдкі луги дають опіки всіх ступенів. Тому при роботі з зазначеними розчинами необхідно застосовувати міри проти розбризкування і використовувати захисний спецодяг та запобіжні окуляри.
5. Наповнення піпеток концентрованими кислотами, лугами шляхом всмоктування ротом категорично забороняється, для цього потрібно користатися сифонами чи спеціальними піпетками з гумовою грушею.

ЗАХОДИ БЕЗПЕКИ ПРИ РОБОТІ З ГОРЮЧИМИ І ЛЕГКОЗАЙМИСТИМИ РЕЧОВИНАМИ

1. При роботі з горючими і легкозаймистими рідинами (сірковуглець, ефір, бензол і т. п.) необхідно виконувати такі правила:
 - а) не користуватися відкритим полум'ям для нагрівання;
 - б) не тримати ці сполуки на столах у великих кількостях;
 - в) переливати на відстані від вогню, а при переливанні великих кількостей усі нагрівачі (газові й інші пальники) у приміщенні згасити;
 - г) не виливати ці речовини в раковину;
 - д) не гріти на відкритому вогні, а тільки на водяній бані.
2. При роботі з масляними банями користатися термометром і не перевищувати температуру займання горючих сполук.
3. Не нахилятися над судиною, у якій що-небудь кипить чи у яку наливається яка-небудь рідина (особливо їдка), тому що бризки можуть потрапити в очі.
4. Пробірку, у якій нагрівається рідина, тримати отвором у бік, а не до себе чи до поруч працюючого, тому що рідина внаслідок нагрівання нерідко розбризкується з пробірки.
5. У випадку займання горючих рідин:
 - а) негайно погасити всі пальники, виключити електронагрівальні прилади;

- б) відставити судини з вогненебезпечними речовинами;
- в) прикрити полум'я мокрою ковдрою, а при потребі засипати піском;
- г) виключити вентиляційні установки;
- д) при необхідності використовувати вуглекислотний вогнегасник;
- е) терміново повідомити пожежну охорону (тел. 101) і керівництво факультету.

ПРАВИЛА РОБОТИ З ЕЛЕКТРИЧНИМИ ПРИЛАДАМИ

1. Перед початком роботи слід перевірити справність електроприладу.
2. Перед включенням прилади повинні бути заземлені, якщо цього вимагають їхні інструкції.
3. Працювати з електронагрівальними приладами, що мають відкриту спіраль, у хімічній лабораторії категорично заборонено.
4. Перед включенням приладу необхідно перевірити справність розетки і цілісність шнурів, особливо від електроплиток.
5. При роботі з приладами, що генерують високу напругу, необхідно ретельно перевірити їх заземлення, а також не торкатися електронесучих вузлів.
6. При роботі з центрифугами центрифужні пробірки попарно врівноважувати на центрифужних вагах і поміщати в гнізда ротора одну напроти одної. При розливі проб гнізда центрифуги ретельно очистити і висушити.
7. Після закінчення роботи необхідно виключити всі використані в роботі електроприлади.
8. Робота з радіоіндикаційним обладнанням вимагає особливої обережності.

Увага! Після вивчення даної інструкції у спеціальному журналі робиться відповідна відмітка, де кожен здобувач ставить свій підпис.

ЗМІСТОВИЙ МОДУЛЬ І. ОСНОВИ ТЕОРІЇ ІНФОРМАЦІЇ, ТЕРМОДИНАМІКИ ТА КІНЕТІКИ БІОЛОГІЧНИХ ПРОЦЕСІВ

КІНЕТІКА БІОЛОГІЧНИХ ПРОЦЕСІВ

Усі біологічні процеси протікають і розвиваються в часі. Найважливішою кількісною характеристикою для опису різних біологічних процесів є швидкість. Вивченням швидкостей реакцій і їхньою залежністю від різних факторів (концентрації речовин, температури, тиску, рН, активаторів, інгібіторів і т. п.) займається кінетика.

Кінетика має важливе практичне і теоретичне значення. Теоретичне значення полягає в дослідженні особливостей протікання того чи іншого процесу, його механізму і можливості на цій основі передбачати спрямованість процесу. Це у свою чергу дозволяє (шляхом створення відповідних умов) змінити швидкість процесу, активно впливати на витрату вихідних і утворення проміжних сполук і продуктів реакції, тобто дає можливість керувати реакціями, що, природно, має важливе практичне значення.

Представимо просте хімічне перетворення в наступному вигляді:



Тоді швидкість реакції V є швидкість накопичення в одиницю часу молекул продукту – $d[P]/dt$. Кінетика ґрунтується на положенні Гульдберга і Вааге, відповідно до якого швидкість реакції пропорційна добутку концентрацій реагуючих речовин. Це положення визначає вплив концентрації на швидкість реакції і *називається основним законом кінетики*.

Для хімічної реакції, записаної в загальному вигляді, швидкість реакції (відповідно до основного закону кінетики) запишеться так:

$$V = d[P] / dt = k [A] [B],$$

де k – постійна швидкості реакції.

Реакції класифікують за багатьма ознаками, але в першу чергу за молекулярністю і загальним (сумарним) порядком. Молекулярність реакції має безпосереднє відношення до механізму реакції і характеризується числом молекул, що беруть участь в елементарному акті хімічного перетворення. Молекулярність реакції може приймати тільки цілочисельні значення, тобто реакції можуть бути моно-, бі-, тримолекулярними. Реакції більшої молекулярності практично не зустрічаються, тому що імовірність одночасного зіткнення чотирьох чи більшої кількості молекул надзвичайно мала. Звідси випливає, що якщо стехіометричні коефіцієнти в рівнянні реакції великі, то ця реакція не є елементарною і протікає в кілька стадій.

Порядок реакції визначають за видом рівняння, що виражає залежність швидкості реакції від концентрації реагуючих речовин. Загальний порядок реакції дорівнює сумі показників ступенів концентрацій речовин, які приймають участь у реакції. Реакції можуть бути нульового, першого, другого, третього і т. п. порядків. Можливий також дробовий порядок, наприклад 2/3. Записане рівняння характеризує реакцію другого порядку, оскільки швидкість реакції залежить від добутку концентрацій і, отже, сума ступенів біля концентрацій дорівнює 2.

Якщо швидкість реакції буде залежати від концентрації в 1-му ступені

$$V = - d[A] / dt = k [A], \text{ коли } A \rightarrow P,$$

тоді це – реакція першого порядку. Знак “мінус” свідчить про витрату речовини А. Константа швидкості реакції буде мати такий вигляд:

$$k = (2,303 \lg ([A] / [A]_0)) / t ,$$

де $[A]_0$ і $[A]$ – початкова і поточна концентрація речовини А.

Прикладом реакції першого порядку можуть служити радіоактивний розпад, розкладання деяких сполук (прості ефіри та ін.), процеси ізомеризації. Відома велика кількість реакцій у розчині, що мають кінетику першого порядку. До них відносяться реакції гідролізу (або в загальному випадку сольволиза), тобто реакції, у яких бере участь розчинник. Прикладом може служити процес гідролізу сахарози з утворенням глюкози і фруктози, що протікає в розведених розчинах при каталітичній дії кислот.

Якщо швидкість реакції не залежить від концентрації, тобто $V = k$ (або $V = \text{const}$), то це – реакція нульового порядку. Наприклад, у ферментативному процесі, у якому концентрація ферменту залишається постійною, а концентрація субстрату настільки перевищує її, що фермент цілком “насичений” субстратом, реакція буде протікати з постійною максимальною швидкістю, що не залежить від подальшого збільшення концентрації субстрату (ефект насичення).

Варто особливо підкреслити, що лише в деяких випадках порядок реакції і її молекулярність збігаються, хоча нерідко на перший погляд здається, що порядок відповідає молекулярності, а молекулярність – стехіометричному рівнянню реакції. Насправді ж такий збіг якщо і буває, то він носить випадковий характер. Тому перш ніж робити висновки про порядок і молекулярність реакції, необхідно провести ретельні дослідження.

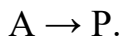
У складних процесах реакція визначеного порядку може складатися з декількох стадій різної молекулярності. Наприклад, на перший погляд здається, що реакція $2\text{NO} + \text{O}_2 \rightarrow 2\text{NO}_2$ є тримолекулярною, насправді ж вона протікає в дві бімолекулярні стадії.

Перша стадія: $2\text{NO} \rightleftharpoons \text{N}_2\text{O}_2$, друга стадія: $\text{N}_2\text{O}_2 + \text{O}_2 \rightarrow 2\text{NO}_2$.

Таким чином, порядок реакції характеризує формально-кінетичну залежність швидкості реакції від концентрації реагуючих речовин, а

молекулярність – елементарний механізм окремих стадій більш складного процесу. Порядок і молекулярність збігаються тільки для простих за механізмом реакцій.

Розглянемо просту реакцію, в якій речовина А перетворюється в речовину Р:



У цій реакції бере участь тільки одна речовина, тобто відбувається мономолекулярна реакція першого порядку. Її швидкість можна визначити так:

$$V = K \cdot a = \frac{dp}{dt} = K \cdot (a_0 - p),$$

де a і p – концентрації речовин А і Р, відповідно зв'язані співвідношенням $a + p = a_0$; t – час реакції; K – константа швидкості реакції. Її зміст стає зрозумілим, якщо вважати, що $a = 1$, тоді $\frac{dp}{dt} = K$. Отже, швидкість реакції дорівнює константі швидкості реакції, коли концентрація реагуючих речовин дорівнює 1. Останнє рівняння можна проінтегрувати та визначити константу швидкості:

$$K = \frac{2,303}{t} \cdot \lg \left| \frac{a_0}{a_0 - p} \right|.$$

Визначена з цього рівняння константа K є константою мономолекулярної реакції першого порядку і має розмірність хв^{-1} . Якщо відобразити на графіку залежність $\lg \left| \frac{a_0}{a_0 - p} \right|$ від t , то вона виявиться прямою лінією з нахилом, тангенс кута якої дорівнює $\text{tg } \varphi = K \cdot 2,303$. Це простий спосіб перевірки, чи відбувається реакція за мономолекулярним типом (рис. 1).

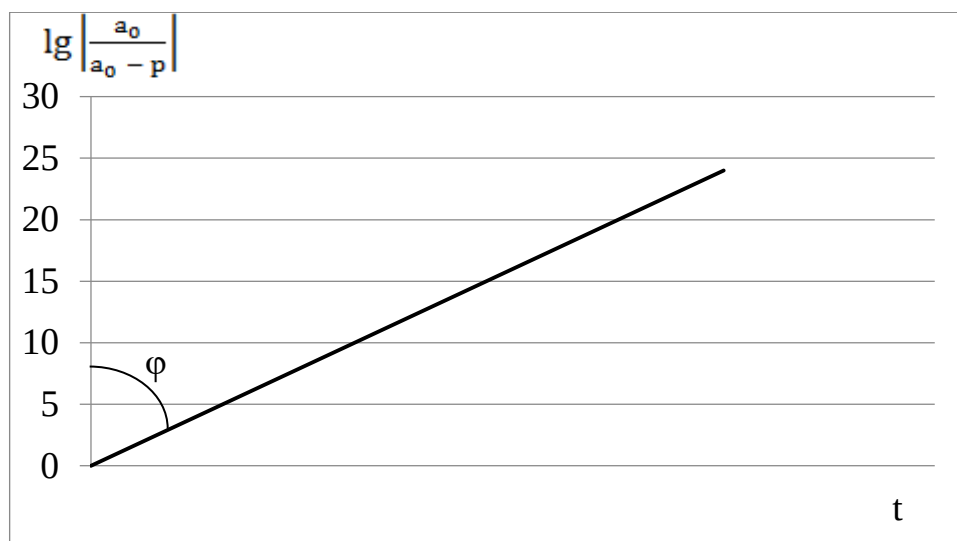


Рис. 1. Залежність $\lg \left| \frac{a_0}{a_0 - p} \right|$ від t в мономолекулярній реакції (Тарновська та ін., 2011).

Примітка. φ – кут нахилу прямої.

Рівняння хімічної кінетики не можуть описати повний хід ферментативних реакцій, тому що ферментативні реакції протікають через кілька стадій. Згідно теорії ферментативних реакцій (Міхаеліс, Ментен, 1913) постулюється утворення проміжного фермент-субстратного комплексу.

Швидкість ферментативної реакції описується рівнянням Міхаеліса – Ментен:

$$V = V_{\max} [S] / (K_m + [S]),$$

де $[S]$ – концентрація субстрата реакції, $V_{\max}$ – максимальна швидкість реакції, K_m – константа Міхаеліса, яка дорівнює відношенню суми констант швидкостей розпаду проміжного фермент-субстратного комплексу до суми констант швидкостей його утворення. Константа Міхаеліса – K_m – дорівнює такій концентрації субстрата, при якій швидкість реакції напівмаксимальна. Графічне відображення цього рівняння має ділянки реакцій першого, нульового (та дробового) порядків. Більш зручним для знаходження K_m та $V_{\max}$ є, наприклад, графік зворотних величин Лайнуівера – Берка, для будови якого потрібно лише дві точки:

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\max} + [S]} + \frac{1}{V_{\max}}.$$

Крім залежності від концентрації реагуючих речовин швидкість реакції сильно залежить від температури. Швидкість більшості реакцій зі збільшенням температури зростає. Найбільш істотним фактором, що визначає характер впливу температури на швидкість реакції, є кінетична енергія реагентів. Добре відоме емпіричне правило, відоме як закон Вант-Гоффа, відповідно до якого при підвищенні температури на 10 °C швидкість реакції зростає в 2 – 4 рази. Відношення констант швидкостей реакцій при двох температурах, що розрізняються на десять градусів, позначають символом Q_{10} і називають температурним коефіцієнтом швидкості реакції:

$$Q_{10} = k_{t+10} / k_t$$

Правило Вант-Гоффа – наближене, тому що температурний коефіцієнт Q_{10} змінюється з температурою. Більш точна залежність швидкості реакції або константи швидкості від температури виражається рівнянням Арреніуса:

$$k = A e^{-E_a / RT},$$

де A – передекспоненціальний множник; T – температура (°K); R – універсальна газова постійна; E_a – енергія активації, що представляє собою той енергетичний потенційний бар'єр, який молекули переборюють при взаємодії.

Логарифмуючи рівняння Арреніуса, одержимо

$$\ln k = \ln A - (E_a / (R \cdot T)).$$

Як видно з такого запису, $\ln k$ (або $\ln V$) буде лінійно залежати від зворотної температури. Останнє рівняння дуже зручне для графічного представлення кінетичних даних. Якщо на осі ординат відкласти $\ln k$, на осі абсцис $1 / T$, то з нахилу цієї залежності можна легко визначити енергію активації E_a . З графіка можна знайти:

$$\operatorname{tg} \alpha = (\ln k_1 - \ln k_2) / (1/T_1 - 1/T_2) = -(E_a / R);$$

$$E_a = R \cdot T_1 \cdot T_2 (\ln k_1 - \ln k_2) / (T_1 - T_2);$$

$$E_a = -\operatorname{tg} \alpha R.$$

Найбільш точно залежність константи швидкості реакції від температури знаходиться з теорії абсолютних швидкостей реакції. Рівняння Ейринга відповідно до цієї теорії дає

$$k = (k_0 T / h) e^{\Delta S / R} e^{-(E_a / RT)},$$

де k_0 – постійна Больцмана ($k_0 = 1,38 \cdot 10^{-23}$ Дж $\cdot$ К $^{-1}$); h – постійна Планка ($h = 6,625 \cdot 10^{-34}$ Дж $\cdot$ с); ΔS – зміна ентропії під час хімічного перетворення. Енергія активації буде тоді визначатися так:

$$E_A = \Delta H^\circ + RT,$$

де ΔH° – ентальпія перехідного стану.

Треба відзначити, що клітини – це колоїдні системи, в яких велике значення має в'язкість розчинів. Тому теорія абсолютних швидкостей, яка розроблена для реакцій у газових фазах, має деякі обмеження. Більш коректною є теорія Крамерса, згідно якої константа швидкості записується наступним чином:

$$k = (A / \eta) e^{-E_a / RT},$$

де η – в'язкість, яка може істотно впливати на швидкість біохімічних реакцій.

Лабораторна робота № 1

ВИЗНАЧЕННЯ ВПЛИВУ КОНЦЕНТРАЦІЙ ФЕРМЕНТУ, СУБСТРАТУ ТА ЧАСУ РЕАКЦІЇ НА ШВИДКІСТЬ ГІДРОЛІЗУ БІЛКА. ВИЗНАЧЕННЯ КОНСТАНТИ МІХАЕЛІСА.

Завдання 1. Визначення константи швидкості гідролізу білка ферментом трипсином.

Мета: навчитися визначати константу швидкості мономолекулярної реакції.

Основні завдання: визначити константу швидкості гідролізу білка ферментом трипсином.

Обладнання, апаратура, матеріали і реактиви:

1. Прилади: вага, водяна баня, термостат, спектрофотометр СФ-26.
2. Посуд, допоміжні знаряддя: пробірки, колбочки, скляні піпетки.
3. Реактиви: глобін, амонійно-карбонатний буфер, трипсин, соляна кислота, нінгідриновий реактив.

Питання для підготовки та обговорення:

1. Визначити поняття кінетики.
2. Що таке швидкість реакції?
3. Чому дорівнює швидкість реакції?
4. Які реакції називають реакціями нульового, пешого та другого порядку?

Хід роботи.

1. Приготувати $2 \cdot 10^{-5}$ М розчин білка. Відважити 66 мг глобіну і розчинити у 50 мл 0,1 М амонійно-карбонатного буфера (рН 8,0).
2. До цього розчину додати 1 мл $2 \cdot 10^{-5}$ М розчину трипсину (2,4 мг N трипсину розчинити у 5 мл 0,0025 Н соляної кислоти). Співвідношення фермент-субстрат 1:50. Суміш швидко збовтати (перемішати).
3. Відібрати в окрему пробірку 0,2 мл цієї суміші і кип'ятити протягом 5 хв (для припинення ферментативної реакції).
4. Колбочку з білком помістити у термостат при температурі 37 °С і через кожні 10 хв відбирати проби по 0,2 мл, кип'ятити їх для припинення реакції.
5. Гідролізувати білок протягом 90 хв. До всіх відібраних і прокип'ячених проб додати по 2 мл нінгідринового реактиву, після чого всі пробірки одночасно помістити на водяну баню, що кипить. Туди ж поставити контрольну пробу (2 мл реактиву без білка). Кип'ятити 15 хв. Розчин у пробірках у ході реакції забарвлюється у фіолетово-синій колір.

6. Усі пробірки зняти з водяної бані, охолодити і фотометрувати на спектрофотометрі при 750 нм або на фотоелектричному колориметрі при зеленому фільтрі. За величиною екстинкції, використовуючи калібрувальну криву, визначити вміст амінного азоту в досліджуваних пробах.

Одержані дані записати у таблицю 1:

Таблиця 1.

Номер пробірки за порядком	Час реакції, хв	Величина екстинкції	Вміст амінного азоту		
			мг у пробі	мМоль у пробі	мМоль в 1 мл
1	0				
2	10				
3	20				
...	...				
9	80				
10	90				

7. Побудувати графік залежності швидкості реакції від часу. Для цього на ординаті відмітити кількість утвореного амінного азоту (мМоль на 1 мл), а на осі абсцис – час у хв. Загальний вигляд графіка зображено на рис. 2.

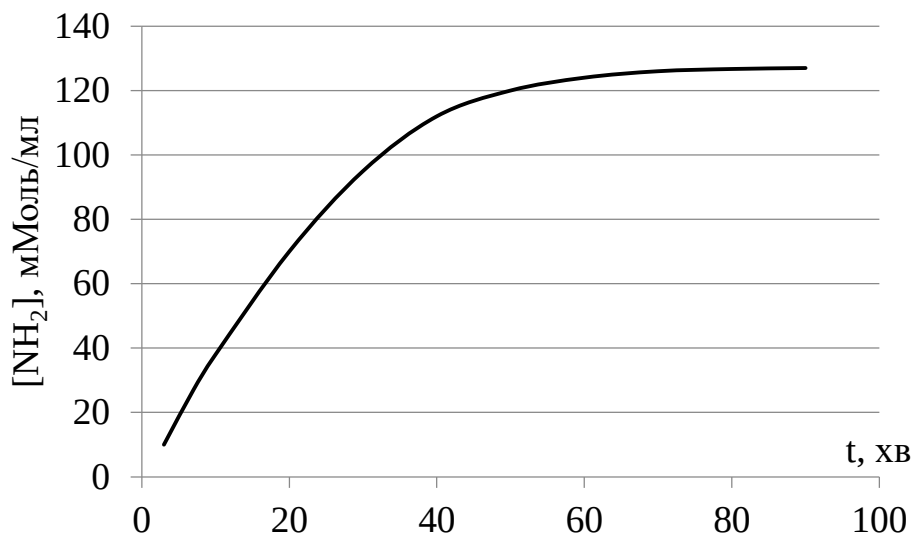


Рис. 2. Залежність швидкості гідролізу глобіну трипсином від часу (Тарновська та ін., 2011).

8. Знайшовши за графіком час (хв) і концентрацію амінного азоту (мМоль на 1 мл), при яких крива ходу швидкості реакції стає паралельною до осі абсцис, розрахувати константу швидкості реакції.

Враховуючи, що при гідролізі білка ми визначаємо наростаючу концентрацію продукту (амінного азоту), а не зменшувану в ході реакції концентрацію білка, використовувати наступне рівняння:

$$K = \frac{2,303}{t} \cdot \lg \left| \frac{P - P_0}{P_0} \right|.$$

Наприклад, початкова концентрація амінного азоту $P_0 = 2$ мМоль на 1 мл. Через 50 хв, коли крива ходу ферментативного процесу стала паралельною до осі абсцис, концентрація амінного азоту P дорівнює 14 мМоль на 1 мл.

$$\text{Отже, } K = \frac{2,303}{50} \cdot \lg \left| \frac{14-2}{2} \right|.$$

$$K = \frac{2,303}{t} \cdot \lg(12) - \lg(2) = 0,046 \cdot (1,079 - 0,301) = 0,357 \text{ хв}^{-1}.$$

Щоб перевірити порядок реакції та правильність розрахованої константи, побудувати графік залежності $\lg \left| \frac{P - P_0}{P_0} \right|$ від часу (див. рис. 1).

Якщо ця залежність виражається прямою лінією з нахилом, коли $\text{tg } \alpha = 2,303 \cdot K$, то це свідчить, що процес відбувається за зразком мономолекулярної реакції.

Висновки: ...

Завдання 2. Залежність швидкості трипсинового гідролізу білка від концентрації ферменту трипсину.

Мета: дослідити залежність швидкості ферментативного процесу від концентрації ферменту.

Основні завдання:

1. Визначити швидкість трипсинового гідролізу білка залежно від концентрації ферменту трипсину.
2. Побудувати графік залежності швидкості реакції від концентрації ферменту.

Обладнання, апаратура, матеріали і реактиви:

1. Прилади: вага, водяна баня, термостат, спектрофотометр СФ-26.
2. Посуд, допоміжні знаряддя: пробірки, колбочки, скляні піпетки.
3. Реактиви: глобін, амонійно-карбонатний буфер, трипсин, соляна кислота.

Питання для підготовки та обговорення:

1. Охарактеризувати молекулярні механізми прискорення ферментативних реакцій, та їх біологічне значення.
2. Як залежить швидкість реакції від температури?

Однією з головних властивостей ферментів є їхня здатність каталізувати певні хімічні реакції. До головних чинників, які визначають початкову швидкість ферментативної реакції, відносять: концентрацію ферменту, концентрацію субстрату, рН, температуру і наявність активаторів чи інгібіторів. Згідно теоретичних розрахунків й експериментальних досліджень, вважається, що швидкість реакції прямо пропорційна концентрації ферменту в реагуючій суміші.

Хід роботи.

1. Приготувати $2 \cdot 10^{-5}$ М розчин білка. Для цього 330 мг глобіну розчинити у 250 мл 0,1 М амонійно-карбонатного буфера (рН 8,0). Розчин розлити у п'ять колбочок по 50 мл.

2. Приготувати 10^{-4} М розчин трипсину. Для цього 24 мг трипсину розчинити у 10 мл 0,0025 Н соляної кислоти. Це основний розчин. З нього приготувати робочі розчини ферменту різної концентрації, розводячи в 2; 4; 8; 16 і 32 рази, тобто концентрація ферменту має становити (таблиця 2):

Таблиця 2.

№	Розведення	Концентрація трипсину
1	-	$10 \cdot 10^{-5}$ М
2	2	$5 \cdot 10^{-5}$ М
3	4	$2,5 \cdot 10^{-5}$ М
4	8	$1,25 \cdot 10^{-5}$ М
5	16	$0,625 \cdot 10^{-5}$ М
6	32	$0,3125 \cdot 10^{-5}$ М

3. По 1 мл розчину різних концентрацій ферменту швидко додати у кожен колбочку (як у таблиці). Перемішати і відбирати по 0,5 мл реагуючої суміші в пробірки, які поміщають на 5 хв у водяну баню, що кипить (для припинення реакції).

4. Колбочки поставити у термостат при температурі 37 °С і через 10 хв відібрати проби об'ємом 0,5 мл у чисті пробірки, кип'ятити їх для припинення реакції. До всіх відібраних проб додати по 2 мл нінгідринового реактиву, після чого їх одночасно помістити на водяну баню. Туди ж поставити паралельно контрольні проби (H_2O + 2 мл нінгідринового реактиву). Через 15 хв пробірки зняти, охолодити; проби фотометрувати на ФЕК при зеленому фільтрі.

5. За калібрувальною кривою визначити вміст азоту. Побудувати графік залежності швидкості реакції (V) від концентрації ферменту.

6. Для обчислення швидкості реакції (V) використовувати формулу:

$$V = K \cdot [E].$$

Для цього для кожної концентрації ферменту слід розрахувати константу швидкості реакції:

$$K = \frac{2,303}{t} \cdot \lg \left| \frac{a}{a-x} \right|,$$

де a – концентрація амінного азоту в нульовий момент часу; x – концентрація амінного азоту після 10-хвилинної інкубації.

Висновки: ...

Завдання 3. Визначення швидкості ферментативного гідролізу білка трипсином залежно від концентрації субстрату. Визначення константи Міхаеліса для цього процесу.

Мета: дослідити залежність швидкості ферментативної реакції від концентрації субстрату.

Основні завдання:

1. Визначити швидкість трипсинового гідролізу білка трипсину залежно від концентрації субстрату.

2. Визначити константу Міхаеліса для цього процесу.

Обладнання, апаратура, матеріали і реактиви:

1. Прилади: вага, водяна баня, термостат, спектрофотометр СФ-26.

2. Посуд, допоміжні знаряддя: пробірки, колбочки, скляні піпетки.

3. Реактиви: глобін, амонійно-карбонатний буфер, розчин CaOH , трипсин, соляна кислота, нінгідринний реактив.

Питання для підготовки та обговорення:

1. Запишіть схематично ферментативну реакцію.

2. Запишіть рівняння Міхаеліса-Ментен.

3. Що таке константа Міхаеліса? Що характеризує константа Міхаеліса-Ментен?

4. Запишіть рівняння Лайнуівера-Берка.

Хід роботи.

1. У п'яти колбочках приготувати розчин білка різної концентрації. Для цього наважки глобіну: 16,5 мг; 66,0 мг; 132,0 мг; 264,0 мг розчинити (кожну окремо) в 50 мл амонійно-карбонатного буфера або 0,01Н розчину NaOH , доведеного до $\text{pH} = 8,0$. Одержати розчини з такими концентраціями білка: $0,5 \cdot 10^{-5}$ М, $1,0 \cdot 10^{-5}$ М, $2,0 \cdot 10^{-5}$ М, $4,0 \cdot 10^{-5}$ М, $8,0 \cdot 10^{-5}$ М.

2. До кожної проби додати 1 мл $2,0 \cdot 10^{-5}$ М розчину трипсину (2,4 мг трипсину розчиняють у 5 мл 0,0025 Н соляної кислоти). Розчини швидко перемішати і відібрати дві проби по 0,1 мл та кип'ятити їх протягом 5 хв.

3. Колбочки поставити у термостат при температурі 37°C і через 10 хв відібрати проби об'ємом 0,1 мл, кип'ятити їх 5 хв для припинення реакції. До всіх проб додати по 2 мл нінгідринного реактиву, після чого одночасно

помістити на водяну баню, що кипить. Туди ж поставити паралельно контрольну пробу (реактиви без білка).

4. Через 15 хв пробірки зняти, охолодити і проби фотометрувати на ФЕК при зеленому фільтрі. За калібрувальною кривою визначити вміст амінного азоту. Побудувати графік залежності швидкості реакції від концентрації субстрату. За допомогою графіка Лаїнуївера – Берка визначити K_m і V_{max} .

Висновки: ...

Лабораторна робота № 2

ВИВЧЕННЯ КІНЕТИКИ ТРАНСПОРТУ РИБОФЛАВІНУ В ЕРИТРОЦИТАХ КРОВІ

Мета: дослідити закономірності надходження вітаміну B_2 в еритроцити в залежності від його концентрації у середовищі.

Основні завдання:

1. Навчитися роботі на флюориметрі та навичкам розрахунків з отриманими після вимірювань даними.
2. Побудувати графік залежності надходження рибофлавіну в еритроцити в залежності від його концентрації у середовищі.

Обладнання, апаратура, матеріали і реактиви:

1. Прилади: вага, водяна баня, термостат, центрифуга, флюориметр.
2. Посуд, допоміжні знаряддя: пробірки, центрифужні пробірки, колбочки, скляні піпетки.
3. Реактиви: розчини рибофлавіну, суспензія еритроцитів.

Питання для підготовки та обговорення:

1. Що вивчає кінетика?
2. Надати визначення поняттю флюорисценції.
3. Який принцип роботи флюориметру?

Хід роботи.

1. У п'ять пронумерованих скляних пробірок налити по 1 мл фізіологічного розчину (контрольні проби), у п'ять пронумерованих центрифужних пробірок налити по 1 мл суспензії еритроцитів (дослідні проби).
2. В усі проби долити по 9 мл розчину рибофлавіну в зростаючій концентрації: 1, 2, 5, 10, 20 мкг/мл. Вміст кожної проби перемішати і помістити у водяну баню з температурою 25°C на 10 хвилин.
3. Усі дослідні проби зрівноважити, а потім відцентрифугувати при 3000 об./хв 10 хвилин.

4. Відцентрифуговані надосадові рідини (НОР) обережно злити в сухі, пронумеровані пробірки і флуориметризувати кожну проти відповідного стандарту.

5. Визначити концентрацію рибофлавіну в НОР усіх дослідних проб, а потім за різницею концентрацій вітаміну B_2 у стандарті і відповідному супернатанті визначити концентрацію вітаміну, що проник в еритроцити крові. Далі визначити кількість рибофлавіну, що потрапила в еритроцити. Для цього поділити отриманий результат на загальну кількість еритроцитів в пробі.

Приклад розрахунку. Припустимо, що стандартна проба при концентрації 1мкг дасть 50 одиниць (за шкалою флуориметра), а невідома концентрація дослідної проби з тієї ж паралелі – 30 одиниць.

Тоді напишемо пропорцію:

Станд₁ 1 мкг/пробу – 50 од.

Досл. НОР₁ x мкг/пробу – 30 од.

$[B_2] \text{ НОР}_1 = (1 \cdot 30) / 50 = 0,6$ (мкг/пробу).

Концентрація рибофлавіну, яка була поглинена еритроцитами буде:

$[B_2] \text{ у эритро.} = [B_2] \text{ Станд.}_1 - [B_2] \text{ НОР}_1 = 1 - 0,6 = 0,4$ мкг/пробу і т. п.

Кількість B_2 /еритроцит = $0,4 / 5 \text{ млн} = 0,08 \cdot 10^{-9}$ мкг/еритроцит.

6. Отримані дані внести у таблицю 3:

Таблиця 3.

№ п/п	Концент- рації B_2 (мкг/мл)	Флуорис- ценція стандарт- них проб	Флуорис- ценція дослідних проб	Концент- рація $[B_2]$ у НОР	Концент- рація $[B_2]$ в еритроци- тах	Кількість B_2 /ерит- роцит
1	1					
2	2					
3	5					
4	10					
5	20					

7. За отриманими результатами побудувати графік залежності проникнення вітаміну B_2 в еритроцити крові від концентрації його в інкубаційному середовищі.

Висновки: ...

Лабораторна робота № 3

ВИЗНАЧЕННЯ ТЕМПЕРАТУРНОГО КОЕФІЦІЄНТУ ТА ЕНЕРГІЇ АКТИВАЦІЇ СКОРОЧЕНЬ ІЗОЛЬОВАНОГО СЕРЦЯ ЖАБИ

Мета: Навчитися обчислювати температурний коефіцієнт та енергію активації складних гетерогенних систем за отриманими даними.

Основні завдання:

1. Навчитися створювати модель роботи складної гетерогенної системи на прикладі ізольованого серця жаби.
2. Навчитися розраховувати температурний коефіцієнт та енергію активації за отриманими даними.

Обладнання, апаратура, матеріали і реактиви:

1. Прилади: водяна баня, термометр, льод, термостат.
2. Посуд, допоміжні знаряддя: вологі камери, скляні піпетки, скляні палички, інструменти для препарування жаби.
3. Реактиви: розчин Рінгеру для холоднокровних.
4. Матеріали: жаби.

Питання для підготовки та обговорення:

1. Що таке енергія активації?
2. Пояснити зв'язок між енергією активації складних гетерогенних систем з коефіцієнтом Вант-Гоффа.
3. Пояснити сутність теорій Ейринга та Крамерса.
4. Охарактеризувати закономірності впливу температури на швидкість реакцій.
5. Охарактеризувати коефіцієнт Максвела-Больцмана.

Хід роботи:

1. Підготувати три вологі камери, в одній з яких установити кімнатну температуру, у двох інших, відповідно, на 10 °C вище і нижче кімнатної.

Вологою камерою служить скляний хімічний стаканчик на 100 мл, закритий кришкою з двома отворами; в один вставити термометр, в інший – канюлю Штрауба, з укріпленням на ній серцем жаби. На дно склянки налити воду з потрібною температурою.

2. *Препарування.* Жабу знерухомити, руйнуючи зондом спинний мозок. Піднявши пінцетом шкіру на черевці, зробити хрестоподібний розріз і відсунути її клаптики в сторони. Ретельно витерти ножиці від слизу, ввести кінчик однієї бранші під грудину і перерізати її. Потім перерізати плечовий пояс посередині і розкрити грудну клітку, щоб грудина не заважала подальшому препаруванню, розсунути м'язи з боків від неї і відкинути кістково-м'язовий шматок назад. Серце звільнити від перикарда, розрізаючи останній ножицями і перерізати вуздечку. За допомогою пінцетів і скляних гачків підвести лігатури під праву і ліву легеневі вени. Зав'язавши лігатури на легеневих венах, на нижній порожній вені і на правій дузі аорти, перерізати приблизно половину діаметру судини, і ввести у розріз кінець канюлі, у яку завчасно налитий розчин Рінгеру. Під час систоли кінчик канюлі проштовхати у порожнину шлуночка.

Поява в канюлі струмка крові підтверджує правильність її введення. Лігатуру, що закріплює серце на канюлі, зав'язати подвійним вузлом.

3. Серце ізолювати, перерізаючи судини дистальніше лігатур. Тонкою піпеткою кілька разів ввести у канюлю розчин Рінгера і відсмоктати його (до припинення надходження крові з порожнини серця в канюлю).

4. Серце відмити ззовні рінгерівським розчином і помістити у вологу камеру. Висота стовпа розчину в канюлі повинна бути постійною і не нижче 2-3 см.

5. Після того, як серце знаходиться у вологій камері 5-10 хвилин при кімнатній температурі, виміряти за який час воно робить 20 скорочень (3-4 рази) і обчислити середню кількість в хвилину. Потім серце перенести у вологу камеру з температурою води на 10 °C вище кімнатної, замінити фізіологічний розчин у канюлі (на 10 °C вище кімнатної) і перерахувати ритм скорочень, як було зазначено вище.

6. Перенести серце в камеру з кімнатною температурою і відстежити відновлення вихідного ритму скорочень. Аналогічним чином провести дослід при температурі нижче на 10 °C кімнатної.

Приклад розрахунку енергії активації скорочень ізолюваного серця жаби. Припустимо, що серце жаби при 18 °C ($T_1 = 273 + 18 \text{ °C} = 291 \text{ K}$) скорочується 20 разів за 38 секунд, при 28 °C ($T_2 = 273 + 28 \text{ °C} = 301 \text{ K}$) - 20 скорочень за 20 секунд. Обчислюється кількість скорочень за 1 хвилину при різних температурах:

- при 28 °C $(20 / 20) \cdot 60 = 60$ скорочень за хвилину;
- при 18 °C $(20 / 38) \cdot 60 = 31$ скорочення за хвилину, тоді

$$Q_{10} = (\text{Число скорочень при } t + 10) / (\text{Число скорочень при } t) = 60 / 31 = 1,9.$$

Обчислюють десятковий логарифм Q_{10} :

$$\text{Lg } 1,9 = 0,278775;$$

Обчислюють величину енергії активації:

$$E_A = 0,46 T_1 \cdot T_2 \cdot \text{Lg } Q_{10} = 0,46 \cdot 291 \cdot 301 \cdot 0,278775 = 11239 \text{ ккал/моль.}$$

Аналогічно обчислити величину Q_{10} і E_a при $T_3 = 273 + 8^\circ\text{C} = 281\text{K}$.

Висновки: ...

Питання для контролю:

1. Охарактеризувати кінетику біологічних процесів, її зв'язок з біологічною енергетикою.
2. Охарактеризувати молекулярність хімічних реакцій. Моно-, бі- і тримолекулярні реакції.
3. Охарактеризувати поняття порядок реакцій, пояснення їх природи.

4. Як впливає концентрація субстратів на швидкість ензиматичних реакцій і складних біологічних процесів?
5. Розкрити основні рівняння ферментативної кінетики (Міхаеліса-Ментен і Лайнувера-Берка), константа Міхаеліса.
6. Надати докази існування ензим-субстратних комплексів.
7. Охарактеризувати вплив температури на швидкість процесів різної природи (фізичних, хімічних, біологічних). Закон Ареніуса. Енергія активації.
8. Охарактеризувати коефіцієнт Q_{10} . Охарактеризувати діаграму Ареніуса.
9. Охарактеризувати автокаталітичні реакції, їх біологічне значення.
10. Охарактеризувати особливості кінетики ланцюгових реакцій.

Література до розділу:

1. Біофізика. Ферментативна кінетика. Динамічні моделі біологічних процесів. Теорія. Лабораторний практикум. Для студентів спеціальності «Біологія» // О. І. Доценко, Г. В. Тарадіна. – Вінниця, ДонНУ імені Василя Стуса, 2017. – С. 5 – 26.
2. Костюк П.Г. Биофизика / П.Г. Костюк, Д.М. Гроздинский, В.Л. Зима и др. – Киев: Вища школа, 1989. – С. 101 - 112.
3. Методичні вказівки для самостійної роботи студентів, лабораторні роботи та завдання із курсу біофізики (Для студентів біологічного факультету усіх форм навчання) / О.В. Запорожченко, Л.М Карпов, С.А. Петров, О.К. Будняк, Н.Л. Федорко. – Одеса, 2003. – С. 8 – 13.
4. Практикум з біофізики : навч. посіб. : [для студ. вищ. навч. закл.] / А.В. Тарновська, М.Б. Галан, Н.П. Головчак, М.В. Бура, Д.І. Санагурський. – Львів : ЛНУ імені Івана Франка, 2011. – С. 49 – 60.

ЗМІСТОВИЙ МОДУЛЬ II. БІОФІЗИКА КЛІТИНИ, БІОФІЗИКА МЕМБРАННИХ ПРОЦЕСІВ, БІОЕЛЕКТРИЧНІ ЯВИЩА

ПРОНИКНІСТЬ КЛІТИН ТА ТКАНИН. НАБРЯКАННЯ ТКАНИН

Проблема проникності має важливе значення в питаннях обміну речовин, розподілі речовин між клітиною і середовищем, при вивченні патології і фізіології. Характер руху речовин через клітинні мембрани різний, одна і та ж речовина може проникати через мембрану різними шляхами. У залежності від типу речовини і її ролі в життєдіяльності клітини використовується один чи кілька шляхів переносу через мембрани.

Основними типами переносу речовин через клітинні мембрани є дифузія, полегшена дифузія, активний транспорт і цитози. Один з видів цитозів – піноцитоз, – добре вивчений на вільно живучих клітинах, наприклад, на амебах, а також на клітинах тканин, ендотелію та ін. Питання про наявність піноцитозу в спеціалізованих клітинах вивчений недостатньо, але вважають, що на мікроскопічному рівні він є універсальним засобом поглинання клітиною макромолекулярних речовин.

Явище дифузії описується законом Фіка. Відповідно до цього закону, швидкість дифузії прямо пропорційна градієнту концентрацій dc / dx і площі поверхні S , перпендикулярної до напрямку дифузії:

$$dm/dt = - DS (dc / dx),$$

де D – коефіцієнт дифузії ($m^2 \cdot c^{-1}$), m – маса.

Якщо два об'єми з різними концентраціями розділені мембраною, дифузія в якій йде значно повільніше, ніж в об'ємах, то весь перепад концентрацій буде локалізований у мембрані, тому що рух в об'ємі буде проходити значно швидше, ніж дифузія через мембрану. Для цього випадку рівняння Фіка можна записати так (закон Коллендера - Берлунда):

$$dm / dt = (D / X) \cdot S (C_0 - C_i),$$

де X – товщина мембрани; C_0 і C_i – концентрації речовин по обидва боки мембрани.

Можна припустити, що товщина біологічних мембран майже однакова, і відношення D / X буде постійною величиною, що характеризує проникність мембрани для даної речовини. Тоді:

$$dm / dt = - pS (C_0 - C_i) = pS (C_i - C_0),$$

де p – коефіцієнт проникності.

Дослідження плазматичної мембрани різними методами, у тому числі і шляхом вивчення її проникності, призводять до висновку про наявність у

мембрані ліпідного шару. Тому речовини, що розчиняються в ліпідах навіть з коефіцієнтом розподілу у системі ліпіди – вода менше 1, порівняно легко проходять через мембрану. Можливість проникнення речовин у клітину за рахунок розчинення в ліпідній фазі мембрани не викликає сумнівів. Але для ряду речовин проникність мембрани вище, а для інших нижче, ніж цього можна очікувати, виходячи з даних про розчинність у ліпідах. Більш низька проникність може бути обумовлена взаємодією речовини з ліпідами мембран і стеричними обмеженнями, пов'язаними з організацією бімолекулярного шару ліпиду. Відхилення у бік більш високої проникності спостерігається для таких речовин, як гліцерин, амінокислоти й інші низькомолекулярні неелектроліти, радіус молекул яких перевищує 0,3 нм.

Вважають, що невеликі молекули проходять через особливі гідрофільні ділянки мембрани, так звані *пори*. Радіус пор оцінюється в 0,3 – 0,4 нм на підставі розмірів гідрофільних молекул, що легко проникають у клітини. У таких випадках збільшення розмірів молекул може знижувати проникність, незважаючи на те, що при цьому гідрофобність речовини може збільшуватися. Таким чином, дифузія хімічних сполук через мембрану може здійснюватися двома шляхами: через гідрофобні ділянки для неполярних і через гідрофільні пори для полярних сполук (молекули невеликих розмірів).

Отже, речовина, що не розчиняється в ліпідах і з розміром молекул більшим 0,3 – 0,4 нм (радіус пір у мембранах більшості клітин), не повинна дифундувати через мембрани. Так, шестиатомні спирти з радіусом молекул 0,42 нм практично не проникають у більшість клітин. Однак глюкоза і деякі інші моносахариди з такими ж розмірами молекул, як правило, добре проникають у клітину.

Молекула глюкози здатна утворювати принаймні 5 водневих зв'язків. Теоретично енергія активації процесу переносу глюкози з водяної фази в гідрофобну, ліпідну зону мембрани, дорівнює приблизно 80 кДж/моль. Однак експериментально знайдена величина, яка не перевищує 16 кДж / моль. Внаслідок цього глюкоза проникає в еритроцити майже в 10000 разів швидше, ніж очікували при пасивному транспорті. Гліцерин проникає значно швидше в еритроцити людини і щурів, чим в еритроцити вівці, свині, корови. Кінетика цього процесу сильно відрізняється від пасивного транспорту. Цей процес також характеризується низькою енергією активації. Висока проникність клітинних мембран стосовно цукрів, амінокислот і інших речовин пояснюється за допомогою так званої *полегшеної дифузії*. Цей процес передбачає наявність специфічних переносників, які зв'язуються з речовинами, що транспортуються, й таким чином полегшують проникність цієї речовини через мембрану. Вважається, що в основі механізму полегшеної дифузії лежить оборотне зв'язування речовини, що транспортується, зі специфічним переносником; утворений комплекс дифундує в товщі мембрани від зовнішньої поверхні до внутрішньої; в міру

звільнення речовини вільний переносник дифундує назад до зовнішньої поверхні мембрани, де з'єднується з новою молекулою речовини, і цикл повторюється. Можна відзначити ряд характерних відмінностей між полегшеною і звичайною дифузією:

1. При полегшеній дифузії односпрямований потік речовини в клітину або з неї повинний задовольняти рівнянню Михаеліса - Ментен. Інакше кажучи, при збільшенні зовнішньої концентрації потік, на відміну від дифузійного, повинен рости нелінійно і наближатися до насичення. Часто таку залежність називають ефектом насичення потоку.

2. Наявність специфічних переносників, взаємодіючих з речовинами визначеної будови, обумовлює різко виражену залежність проникаючої здатності речовини від її хімічної структури, зокрема від просторової конфігурації його молекул. Наприклад, просторове розміщення ОН- і Н-груп в оптичних ізомерах цукрів відіграє вирішальну роль при впливі на їхню проникаючу здатність. Переносники відрізняють D- і L- ізомери деяких цукрів і амінокислот.

3. Полегшена дифузія на відміну від простої може гальмуватися деякими сполуками (іноді в досить малих концентраціях), що блокують переносник.

Найбільш важливою формою проходження речовин через мембрани є *активний транспорт*, при якому речовини накопичуються в концентраціях, значно перевищуючих їхні концентрації в навколишньому середовищі. Накопичення речовин всередині клітини може відбуватися в результаті їхньої фізичної сорбції, хімічного включення в структурні компоненти клітини і переносу проти градієнту концентрації за рахунок використання енергії метаболізму.

Відповідно до класичної моделі активного переносу, розчинена молекула з'єднується з переносником. По один бік мембрани переносник у результаті хімічної реакції гідролізу АТФ здобуває спорідненість до молекули, що буде переноситися, і приєднує її до себе. Утворений комплекс переносника з цією молекулою проходить через мембрану. Потім відбувається друга хімічна реакція, у результаті якої спорідненість переносника до молекули, що транспортується, зменшується і вона звільняється. Переносник знову проходить через мембрану, але вже в зворотному напрямку, і цикл повторюється.

Процес модифікації структури переносника відбувається з витратою енергії. Для кожної речовини існує свій переносник, що модифікує свою структуру, взаємодіючи з АТФ за участю ферменту, специфічного для даного переносника (або переносник сам виконує функцію ферменту, наприклад, транспортні АТФ-ази).

Відповідно до іншої точки зору, існує один універсальний механізм енергозабезпечення активного переносу різних сполук (і тих, що мають заряд, і нейтральних). Це – електрохімічні потенціали іонів Na^+ або протонів, що утворюються завдяки роботі Na^+ , K^+ -залежної АТФ-ази або окислювально-відновлюючих ферментів дихального ланцюга.

Проблема специфічності переносу окремих сполук вирішується шляхом створення порівняно простих переносників, які “впізнають” компонент, що транспортується. Якщо речовина має заряд, що дозволяє транспортуватися у потрібному напрямку, то достатньо простого утворення проникаючого комплексу речовина – переносник. Якщо ж речовина, що транспортується, не має заряду (цукри, нейтральні амінокислоти), то використовуються переносники, здатні поряд з даними молекулами зв’язуватися також з іонами Na^+ або протонами і здобувати необхідний заряд. Енергетичне сполучення пасивного транспорту з будь-яким термодинамічним градієнтом, що утвориться за рахунок витрат енергії метаболізму, додає пасивному транспорту всі риси активного.

Моделлю клітинної мембрани, що має однобічну проникність для ряду слабких електролітів, є шкіра жаби, що складається із сполучнотканинних шарів (мають слаболужну активну реакцію і характеризуються низьким адсорбційним рівнем) і епітеліальних шарів (клітини яких мають низьку кислу реакцію і характеризуються високим адсорбційним рівнем).

Такій мембрані властива виражена однобічна провідність для барвників групи тіазонів (метиленовий синій, толуїдиновий синій, тіонін) у напрямку від сполучної тканини до епітелію.

Крім того, шкіра жаби характеризується вираженою однобічною проникністю і для деяких лужно-кислотних індикаторів. Зокрема, лужний барвник – нейтральний червоний – проникає в напрямку від сполучної тканини, де його молекули недисоційовані, до епітелію, у якому відповідно з його активною реакцією молекули дисоційовані.

Однобічна проникність зовсім не є раз і назавжди обумовленою властивістю мембрани. Вільно змінюючи активну реакцію розчину барвника і сольового розчину, що прилягає до шкіри з протилежного боку, можна підсилити, послабити, блокувати однобічний рух і навіть змінити його напрямок на діаметрально протилежний.

Набрякання – це поглинання рідини гелем, під час якого збільшуються об’єм і вага. Розрізняють два етапи набрякання. Перший (початкова стадія набрякання) зумовлений утворенням сольватних оболонок навколо активних груп, які містяться на поверхні колоїдних частинок. Утворення такого мономолекулярного шару розчинника навколо колоїдної частинки супроводжується виділенням тепла. Другий етап набрякання (його остання стадія) пов’язаний із проникненням води в міжміцелярні простори. Це відбувається внаслідок великої різниці між швидкістю дифузії високомолекулярної сполуки і низькомолекулярного розчинника (води).

Інколи може відбуватися часткове розчинення гелю. Процес не супроводжується помітним тепловим ефектом.

Дослідження динаміки набрякання засвідчує, що при набряканні, точніше, на його першому етапі, відбувається зменшення сумарного об'єму гелю, який набрякає, і рідини, яка його обмиває, котре називається «стрикцією», або «контракцією». В основі цього явища лежить щільне розміщення сольватних оболонок навколо міцел гелю і часткове проникнення молекул розчинника всередину самих міцел. Це явище простежується і в білках живої тканини. Кінетику набрякання біополімера можна описати таким рівнянням:

$$W_{(V)} = dV / dt = K (V_{\infty} - V_t),$$

де W – швидкість набрякання; V_t – об'єм (проти зразка) в момент часу t ; V_{∞} – максимально можливий об'єм (проти зразка); K – константа (залежить від властивостей біополімера, розчинника і розмірів зразка).

Вивчення кінетики набрякання та стрикції дало змогу охарактеризувати взаємодію білків тканин із низкою патогенних чинників – вірусами, бактеріальними токсинами, алергенами і т. п.

Досліджуючи набрякання гелю, необхідно чітко відрізнити такі два поняття, як ступінь і швидкість набрякання. Ступінь набрякання визначає граничну кількість рідини, що поглинається одиницею ваги або об'ємом колоїда (тканини). Вона залежить від сольватації міцел, еластичності гелю, його стійкості та здатності до розчинення, а також від температури.

На швидкість набрякання впливає кількість рідини, поглиненої при набряканні за одиницю часу. Вона залежить від внутрішнього тертя поглиненої гелем рідини і мало залежить від температури. Дослідження кінетики набрякання свідчать, що цей процес відбувається за законом мономолекулярної реакції.

Протоплазма ізольованих клітин і тканин дуже набрякає у воді та водних розчинах. Ураховуючи, що клітини і тканини містять у собі велику кількість води і не є сухими гелями, закономірності, виявлені на сухих гелях, можуть бути перенесені на живі об'єкти з деякими відхиленнями.

Загальні закономірності процесу набрякання, його ступінь і швидкість визначають за фізико-хімічними властивостями структури самих тканин.

У життєдіяльності організму набрякання біоколоїдів відіграє важливу роль і є одним із чинників, які регулюють водний баланс клітин і тканин. Ступінь набрякання тканин залежить від їхнього функціонального стану. Він різко змінюється при патологічних процесах (опіки, запалення, злоякісні новоутворення). Значний вплив на процес набрякання має сольовий склад середовища, концентрація водневих іонів, колоїдно-осмотичний тиск і дія багатьох інших фізико-хімічних чинників. На швидкість і ступінь набрякання гелів і тканин вирішальний вплив мають катіони й аніони солей. Найбільше набрякання спричиняють іони CNS^- і найменше іони SO_4^{2-} .

Значний вплив на набрякання має концентрація водневих іонів. Підкислення або підлужнення середовища до певної межі збільшує ступінь набрякання. При подальшому збільшенні кислотності чи лужності середовища набрякання спадає. Зокрема, під час запальних процесів збільшення концентрації водневих йонів і підвищення осмотичного тиску (що відбувається внаслідок розпаду білків і збільшення загальної кількості молекул) веде до підвищення ступеня набрякання біоколоїдів.

Висновки про ступінь і швидкість набрякання біологічних тканин роблять на основі збільшення їхнього об'єму або ваги. Найчастіше в таких випадках застосовують вагові методи: вагу гелю, що набрякає (живої тканини), визначають на торзійній вазі.

Ступінь набрякання можна розрахувати за формулою:

$$\alpha_m = (m_t - m_0) / m_0 ,$$

де α_m – ступінь набрякання; m_0 – наважка вихідного зразка; m_t – наважка зразка через час t .

Ваговий метод, порівняно з об'ємом, є менш точним, але він є більш простим для виконання і тому його успішно застосовують як для порівняння здатності різних тканин до набрякання, так і для порівняння дії різних фізико-хімічних чинників на одну і ту ж тканину.

Лабораторна робота № 4

ДОСЛІДЖЕННЯ ПРОНИКНОСТІ ТА НАБРЯКАННЯ ТКАНИН ЖАБИ

Завдання 1. Дослідження впливу активної реакції розчину на однобічну проникність шкіри жаби для барвника нейтральний червоний

Мета: дослідити закономірності проникнення барвника нейтральний червоний через шкіру жаби в залежності від рН середовища.

Основні завдання:

1. Визначити параметри досліду, які найбільш сприятливі для транспорту барвника крізь шкіру жаби.
2. Визначити кількість барвника, що дифундував крізь шкіру жаби, у кожному із досліджених варіантів.

Обладнання, апаратура, матеріали і реактиви:

1. Прилади: фотоелектроколориметр, термостат.
2. Посуд, допоміжні знаряддя: кювети, набір препаратувальних інструментів, скляні циліндри.
3. Реактиви: фізіологічний розчин для холоднокровних (розчин Рінгера), 0,125 % розчин нейтрального червоного, розчини Na_2HPO_4 та KH_2PO_4 для приготування буферних розчинів, 2 % H_2SO_4 .

4. Матеріали: жаби, нитки, скотч.

Питання для підготовки та обговорення:

1. Охарактеризувати молекулярні моделі біомембран.
2. Охарактеризувати процеси проникності та транспорту речовин через біомембрани.
3. Які явища лежать в основі проникнення речовин в клітини та тканини?
4. Чим відрізняється проста дифузія від полегшеної дифузії?
5. Охарактеризувати активний транспорт.
6. Що таке цитози?

Хід роботи.

1. Приготувати 0,125 % розчин нейтрального червоного на фізіологічному розчині і буферні суміші по Серенсену, зливаючи вихідні розчини солей (11,876 г/л $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ і 9,078 г/л KH_2PO_4) у наступних співвідношеннях (таблиця 4):

Таблиця 4.

pH	1/15M Na_2HPO_4 , мл	1/15M KH_2PO_4 , мл
5,28	0,25	9,75
7,73	9,0	1,0

2. Шкіру жаби (1) закріпити за допомогою міцної нитки на скляних циліндрах (2), заповнити розчином барвника (3) до рівня попередньо забуференого сумішшю фосфатного буфера (1 об'єм фосфатної суміші на 2 об'єми фізіологічного розчину або розчину барвника).

3. Циліндри помістити у скляні стакани (4) із забуференими розчинами хлористого натрію, щоб рівні рідин збігалися (рис. 3).

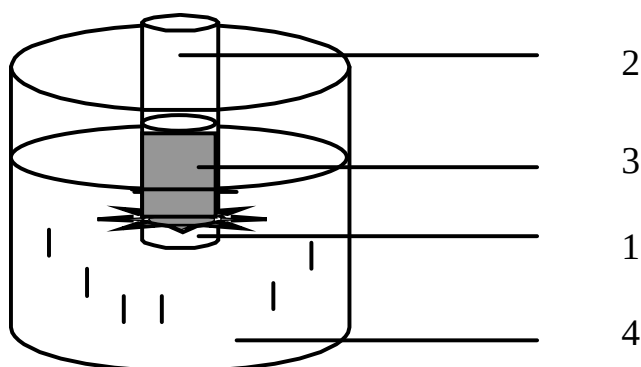


Рис. 3. Стаканчик із забуференим розчином хлористого натрію і зануреним в ньому циліндром із розчином барвника та шкірою жаби.

4. Варто використовувати наступні сполучення значень активної

реакції зовнішнього розчину, розчину барвника і типу шкіри жаби (таблиця 5):

Таблиця 5.

№	Варіант шкіри жаби	Зовнішній розчин	Розчин барвника
1	Нормальна	5,28	5,28
1'	Вивернута	5,28	5,28
2	Нормальна	5,28	7,73
2'	Вивернута	5,28	7,73
3	Нормальна	7,73	5,28
3'	Вивернута	7,73	5,28
4	Нормальна	7,73	7,73
4'	Вивернута	7,73	7,73

Таким чином, в одному варіанті шкіра жаби направлена всередину циліндра епітеліальним шаром (Нормальна шкіра), а в іншому сполучнотканинним (Вивернута шкіра).

5. Стаканчики з розчинами і зануреними в них циліндрами із шкірою помістити у термостат при 22 °С. Перед колориметруванням до розчинів, що містяться в стаканах, додати по одній краплі 2 % розчину H_2SO_4 . Як контроль використати 0,125 % розчин барвника на відповідному буферному розчині, підкислений 2 % розчином H_2SO_4 .

6. Концентрацію розчинів розраховувати за формулою:

$$x = \frac{B \cdot 0,125}{A} \%,$$

де В – екстинція дослідного розчину, А – екстинція відповідного розчину 0,125 % барвника.

7. Результати дослідів занести в таблицю 6:

Таблиця 6.

Шкіра жаби	рН		Концентрація нейтрального червоного в зовнішньому розчині
	Зовнішній р-н	Внутрішній р-н	
Нормальна	5,28	7,73	
Вивернута	5,28	7,73	
Нормальна	7,73	5,28	
Вивернута	7,73	5,28	
...			

Висновки: ...

Завдання 2. Дослідження ваговим методом набрякання тканин жаби.

Мета: вивчити дію різних речовин на процес набрякання окремих тканин жаби.

Основні завдання:

1. Відпрепарувати досліджуваний матеріал (тканину).
2. Простежити набрякання шкіри, стегового м'яза і печінки жаби.
3. Проаналізувати дію кислоти та лугу на процес набрякання стегового м'яза жаби.
4. Визначити вплив рН розчину на процес набрякання м'язової тканини.

Обладнання, апаратура, матеріали і реактиви:

1. Прилади: торзійні ваги, годинник (секундомір).
2. Посуд, допоміжні знаряддя: набір препарувальних інструментів, бюкси, фільтрувальний папір.
3. Реактиви: фізіологічний розчин для холоднокровних (розчин Рінгера); 0,1 Н розчин HCl, 0,1 н розчин NaOH, фосфатний буфер з рН 5,2; 7,1 і 8,0.
4. Матеріали: жаби.

Питання для підготовки та обговорення:

1. Надати визначення терміну «набрякання».
2. Охарактеризувати етапи набрякання.

Хід роботи.

1. Знерухомити жабу, відпрепарувати шматочки досліджуваних тканин, промити їх фізіологічним розчином для холоднокровних від крові та слизу, обережно підсушити фільтрувальним папером.

2. З відпрепарованих шматочків кожної тканини приготувати по дві, приблизно однакові (в межах від 100 до 200 мг), наважки. Водночас важливо не пошкодити тканину: це змінить її поверхню, яка набрякає, і спотворить результати досліду.

3. Наважки тканин помістити в окремі бюкси з досліджуваною рідиною, в якій вони мають набрякати, і яка має повністю покривати тканину.

4. Через кожні 5 хв наважку тканини виймати з бюкса, обережно підсушувати фільтрувальним папером і зважувати. Потім знову помістити в бюкс. Після трьох зважувань інтервал часу збільшити до 10 хвилин.

5. Зважування проводити до тих пір, поки вага наважки тканини не перестане змінюватись, і результати двох останніх зважувань будуть однакові.

6. *Дослідження набрякання різних тканин у фізіологічному розчині.* Дослід проводять зі шматочками шкіри, стегового м'яза і печінки жаби,

наважки яких помістити у фізіологічний розчин для холоднокровних. Вимірювання провести у послідовності, вказаній у порядку виконання роботи.

7. *Дослідження впливу кислоти і лугу на набрякання м'язової тканини.* Дослід виконують з трьома шматочками стегнового м'яза жаби. Один з них помістити у фізіологічний розчин, другий – у фізіологічний розчин, додаючи кислоту (0,4 мл 0,1 Н розчину HCl на 5 мл фізіологічного розчину), а третій – у фізіологічний розчин, додаючи луг (0,4 мл 0,1 Н розчину NaOH на 5 мл фізіологічного розчину). Вимірювання провести у вказаній вище послідовності.

8. *Дослідження впливу рН розчину на набрякання м'язової тканини.* Дослід виконують з чотирма шматочками стегнового м'яза жаби. Один з них помістити у фізіологічний розчин, а три інші – у фізіологічний розчин, додаючи фосфатний буфер (до 9 мл фізіологічного розчину додають по 1 мл фосфатного буфера) з рН 5,2; 7,1 і 8,0. Вимірювання провести у вказаній вище послідовності.

9. Результати досліджень записати в таблицю 7:

Таблиця 7.

Вид тканини	Вихідна вага тканини, мг	Вага тканини (мг) через певні проміжки часу від початку дослідів				
		5 хв	10 хв	15 хв	25 хв	35 хв

10. Використовуючи отримані дані з п.п. 6 – 8 даної роботи, побудувати графіки залежності набрякання тканин жаби від часу та впливу фізико-хімічних чинників. Зробити висновки.

Висновки: ...

Питання для контролю:

1. Охарактеризувати сучасні моделі будови біомембран.
2. Охарактеризувати фізико-хімічні властивості штучних і біологічних мембран.
3. Охарактеризувати методи вивчення проникності біомембран.
4. Охарактеризувати пори, іонні канали, кінетику транспорту сполук через іонні канали.
5. Охарактеризувати проникність біомембран для слабких електролітів. Розкрити вплив на неї реакції середовища (рН).
6. Охарактеризувати закони Фіка і Колендера-Берлунда.
7. Охарактеризувати процеси полегшеної (або прискореної) дифузії речовин у клітину.
8. Визначити характеристики активного транспорту через мембрани для нейтральних молекул та іонів.

9. Яким рівнянням описується кінетика набрякання біополімера?
10. Надати визначення «ступінь набрякання»?
11. Надати визначення «швидкість набрякання»?
12. Охарактеризувати методи вивчення процесу набрякання тканин?

Література до розділу:

1. Біофізика. Фізичні методи аналізу та метрологія : підручник / Е.І. Личковський, В.О. Тіманюк, О.В. Чалий [та ін.] ; за ред. Е.І. Личковського, В.О.Тіманюка. – Вінниця : Нова книга, 2014. – С. 61 – 102.
2. Костюк П.Г. Биофизика / П.Г. Костюк, Д.М. Гроздинский, В.Л. Зима и др. – Киев: Вища школа, 1989. – С. 148 – 199.
3. Методичні вказівки для самостійної роботи студентів, лабораторні роботи та завдання із курсу біофізики (Для студентів біологічного факультету усіх форм навчання) / О.В. Запорожченко, Л.М Карпов, С.А. Петров, О.К. Будняк, Н.Л. Федорко. – Одеса, 2003. – С. 14 – 19.
4. Практикум з біофізики : навч. посіб. : [для студ. вищ. навч. закл.] / А.В. Тарновська, М.Б. Галан, Н.П. Головчак, М.В. Бура, Д.І. Санагурський. – Львів : ЛНУ імені Івана Франка, 2011. – С. 33 – 36.

БІОФІЗИКА БІОМЕМБРАН

Біологічні мембрани є найважливішими структурами в клітині, на яких реалізується більшість біохімічних і біофізичних процесів. В даний час встановлена не тільки їхня білково-ліпідна природа, але і показана наявність у них пір, специфічних іонних каналів, а також цілого ряду індивідуальних ферментів і мультиензимних комплексів.

Лабораторна робота № 5

ВИВЧЕННЯ СТАБІЛЬНОСТІ БІОМЕМБРАН

Завдання 1. Визначення розміру молекул за допомогою моношарів.

Щоб визначити розміри молекул, потрібно переконатися у їхній наявності у розчині. Для цього розглянемо розпливання краплі оливкової олії об'ємом V на поверхні чистої води. Можна припустити, що, розпливаючись по максимальній площі, олія утворює такий шар, який відповідає діаметру молекули. Вимірюючи площу плівки S за максимального розпливання олії, з відношення

$$d = V / S$$

можна оцінити розміри молекул. Цим способом було оцінено розмір (діаметр) молекул олії, $d \approx 4 \cdot 10^{-9}$ м.

За сучасними методами вже знайдено розміри значно менших молекул. Наприклад, лінійні розміри молекул кисню становлять $3 \cdot 10^{-10}$ м, а молекули водню – $2,6 \cdot 10^{-10}$ м.

Розмір молекули – величина умовна. Між молекулами, разом із силами притягання, діють і сили відштовхування, тому молекули можуть наближатися лише до певної відстані. Відстань найменшого зближення центрів двох молекул називають ефективним діаметром молекули. Тому дуже наближено можна вважати, що молекули речовин мають форму кулі.

Однак, вважаючи молекулу кулею, можна знайти наближене значення її діаметра з таких міркувань.

Густина будь-якої речовини

$$\rho = m / V = \mu / V_{\mu}$$

де $V_{\mu} = V_0 \cdot N_A$ - молярний об'єм; V_0 – об'єм однієї молекули.

$$\rho = \frac{\mu}{4 \cdot \pi \cdot R^3 \cdot N_A},$$

$$\rho = \frac{6 \cdot \mu}{\pi \cdot d^3 \cdot N_A}.$$

Тоді діаметр молекули будь-якої однорідної речовини ($\rho = \text{const}$) буде дорівнювати:

$$d = \sqrt{\frac{6 \cdot \mu}{\pi \cdot \rho \cdot N_A}}.$$

Мета: навчитися визначати розмір молекул за допомогою моношарів.

Основні завдання:

1. Визначити середнє значення, розрахувати довжину і площу поперечного перерізу молекул олеїнової кислоти за формулами.

Обладнання, апаратура, матеріали і реактиви:

1. Посуд, допоміжні знаряддя: пластмасова ванночка, піпетки, мірні колби, лінійка.

2. Реактиви: тальк, бензол, олеїнова кислота.

Питання для підготовки та обговорення:

1. Проаналізувати дослід з шаром олії.
2. Охарактеризувати розмір молекули.
3. За якою формулою визначаємо діаметр молекул?
4. За якою формулою визначаємо густину речовин?

Хід роботи.

1. Заповнити ванночку дистильованою водою.
2. Покласти на воду дві смужки паперу і обережно насипати між ними тальк.
3. Забрати одну смужку так, щоб не порушити границі тальку.
4. Приготувати 0,001 % розчин олеїнової кислоти в бензолі.
5. На поверхню води вилити 0,3 см³ розчину олеїнової кислоти.
6. За допомогою паперової смужки стиснути моношарову плівку.
7. За допомогою лінійки виміряти довжину (l) і ширину (d) моношару.
8. Потім ванночку промити і повторити такі самі вимірювання для 0,4; та 0,5 см³ розчину олеїнової кислоти.
9. З отриманих даних визначити середнє і розрахувати довжину (δ , м) і площу поперечного перерізу (q , нм²) молекул олеїнової кислоти за такими формулами:

$$\delta = \frac{V}{l \cdot d},$$

$$q = \frac{l \cdot d \cdot M}{V \cdot \rho \cdot N},$$

де V – об'єм моношару; M – молекулярна маса олеїнової кислоти (282,27); ρ – густина олеїнової кислоти (898 кг/м³); N_A – число Авогадро ($6,02 \cdot 10^{23}$).

Висновки: ...

Завдання 2. Вплив різних сполук на осмотичну резистентність плазматичних мембран еритроцитів крові.

Еритроцити є зручною моделлю для вивчення транспорту речовин і дослідження стійкості мембран при впливі зовнішніх факторів (іонний склад, температура, поверхнево-активні речовини, іонізуюче випромінювання та ін.), унаслідок відсутності органел у їх зрілих формах і можливості виділення з крові еритроцитів різного віку.

Резистентність – властивість плазматичних мембран еритроцитів протистояти руйнівним впливам різних фізичних і хімічних факторів. Експериментальними дослідженнями було показано, що резистентність еритроцитів у значній мірі визначається їхнім віком: у молодих резистентність значно вища (друга група стійкості), ніж у старих (перша група стійкості).

Резистентність еритроцитів можна досліджувати за дії на них гіпотонічних розчинів і гемолітичних речовин, зокрема – розведеної соляної кислоти. Крива розподілу еритроцитів за їхньою стійкістю до цих агентів зветься *еритрограмою*.

Метод еритрограм. Принцип методу полягає у фотоколориметричному вимірі динаміки розпаду еритроцитів під дією гемолітичної речовини (соляної кислоти). Як критерій стану еритроцитів використовується їхня здатність до гемолізу. Час дії соляної кислоти служить характеристикою стійкості еритроцитів. Реакція гемолізу протікає при постійній температурі та концентрації соляної кислоти.

Мета: навчитися методу еритрограми та дослідити вплив вітамінів, антиоксидантів та інших сполук на хід гемолізу еритроцитів.

Основні завдання:

1. Отримати динаміку руйнування еритроцитів під впливом гемолітичної речовини (соляної кислоти), зробити розрахунки та побудувати еритрограму.

2. Визначити дію різних сполук на еритрограми.

Обладнання, апаратура, матеріали і реактиви:

1. Прилади: фотоелектроколориметр (ФЕК).
2. Посуд, допоміжні знаряддя: циліндри на 100 мл, піпетки.
3. Реактиви: фізіологічний розчин, 0,004 н HCl на фізіологічному розчині, оксалат Na (0,1 М розчин), нікотинова кислота (30 мкг/мл), піридоксин (30 мкг/мл), епігід (30 мкг/мл).

Питання для підготовки та обговорення:

1. Охарактеризувати явище гемолізу еритроцитів.
2. Охарактеризувати еритроцити.
3. Що таке еритрограма?
4. Проаналізувати метод еритрограм.

Хід роботи.

1. Приготувати клітинні суспензії еритроцитів крові щура у фізіологічному розчині з розрахунку 0,1 мл $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ (0,1 М розчин) на 0,9 мл крові. Взятую кров перемішати з оксалатом натрію і швидко злити у пробірку. Оксалат зв'язує іони натрію і кальцію і кров втрачає здатність утворювати згусток (фібринові нитки). Оксалатну кров центрифугувати протягом 2 хвилин при 3000 об/хв. Потім за допомогою піпетки відокремити осад (еритроцити) від плазми крові, що знаходиться в надосадовій рідині. Отримані еритроцити промити фізіологічним розчином. Для цього до еритроцитів додати подвійний або потрійний об'єм фізіологічного розчину, знову центрифугувати 2 хвилини при 3000 об/хв і відділити еритроцити від розчину.

2. Для одержання стандартної концентрації еритроцитів осад після центрифугування розвести фізіологічним розчином у 100 разів, отриманий розчин налити у кювету, поміщену перед лівим пучком світла ФЕКа при червоному світлофільтрі, і додати фізіологічний розчин до оптичної щільності 0,700 за шкалою ФЕКа.

3. Помітивши час, змішати суспензію еритроцитів у кюветі з 1 мл 0,004 н НСІ і через 30 секунд зробити перше визначення екстинції $E_{0'30''}$. Потім кожні 30 секунд робити нове визначення екстинції $E_{1'00''}$, $E_{1'30''}$ і т. п., поки величина екстинції не перестане зменшуватися. Останній вимір не дорівнює нулю, тому що під час гемолізу за дією соляної кислоти з гемоглобіну утворюється гематин, який є джерелом остаточного поглинання розчину. Отримані дані вносимо у другу колонку таблиці.

4. Червоний фільтр практично не чутливий до кольору гемоглобіну, тому екстинція залежить від концентрації еритроцитів у розчині. Поступове зменшення екстинції, що спостерігається через інтервали 30 сек, є наслідком руйнування еритроцитів, причому спочатку руйнуються ті форми, резистентність яких до соляної кислоти слабкіша. Далі, на кожний інтервал виміру (кожні 30 с) обчислити різницю зменшення екстинції, приймаючи різницю $\Delta E = E_t - E_{(t+0,5)}$. Вважається, що до стадії гемолізу відбуваються процеси підвищення розмірів еритроцитів, тому за *початкову* оптичну густину приймають $E = 0,400$. Ці дані записати у 3-тю колонку.

5. Далі розрахувати відсоток різниці оптичних щільностей. Для цього, за 100 % приймають різницю між показниками *початкової* оптичної щільності і оптичної щільності після закінчення гемолізу. Згідно таблиці, це $\Delta E_{\max} = 0,400 - 0,050 = 0,350$, тобто 0,350 приймається за 100 %. Відсотковий розподіл еритроцитів за їхньою стійкістю (відсоток різниці оптичних щільностей) розрахувати за формулою:

$$\% \Delta E = \frac{\Delta E}{\Delta E_{\max}} \cdot 100\%.$$

Дані занести у 4-ту колонку таблиці.

6. За даними 4-ого стовпчика побудувати інтегральну S-образну криву (еритрограму) залежності $\% \Delta E$ від часу t , що відбиває розвиток гемолізу (приклад, див. рис. 3). Накопичення гемолізу з часом розрахувати у 5-му стовпчику, який на кінець гемолізу досягає 100 % (± 1 %).

Подібні розрахунки пропонується робити у Excel, або у еквівалентній програмі. Приклад розрахунків на основі даних досліджу (контрольна проба) наведено у таблиці 8.

Таблиця 8.

Час гемоліза, t , хв	Оптична щільність, E	Різниця оптичних щільностей, ΔE	Відсоток різниці оптичних щільностей, $\% \Delta E$	Сума відсотків, $\Sigma \% E$
1	2	3	4	5
0	0,700			
0,5	0,420			
1,0	0,418			
1,5	0,412			
2,0	0,412			
2,5	0,410			
3,0	0,408			
3,5	0,408			
4,0	0,402			
4,5	0,400	0,002	0,6	0,6
5,0	0,398	0,004	1,1	1,7
5,5	0,394	0,006	1,7	3,4
6,0	0,388	0,012	3,4	6,9
6,5	0,376	0,012	3,4	10,3
7,0	0,364	0,013	3,7	14,0
7,5	0,351	0,014	4,0	18,0
8,0	0,337	0,019	5,4	23,4
8,5	0,318	0,022	6,3	29,7
9,0	0,296	0,027	7,7	37,4
9,5	0,269	0,036	10,3	47,7
10,0	0,233	0,022	6,3	54,0

Час гемоліза, t, хв	Оптична щільність, Е	Різниця оптичних щільностей, ΔE	Відсоток різниці оптичних щільностей, % ΔE	Сума відсотків, $\Sigma\% E$
1	2	3	4	5
10,5	0,211	0,023	6,6	60,6
11,0	0,188	0,022	6,3	66,9
11,5	0,166	0,022	6,3	73,1
12,0	0,144	0,021	6,0	79,1
12,5	0,123	0,020	5,7	84,9
13,0	0,103	0,020	5,7	90,6
13,5	0,083	0,018	5,1	95,7
14,0	0,065	0,009	2,6	98,3
14,5	0,056	0,006	1,7	100,0
15,0	0,050	0,000	0,0	

Приклад еритрограми, побудованої за даними таблиці 8, наведено на рис. 4.

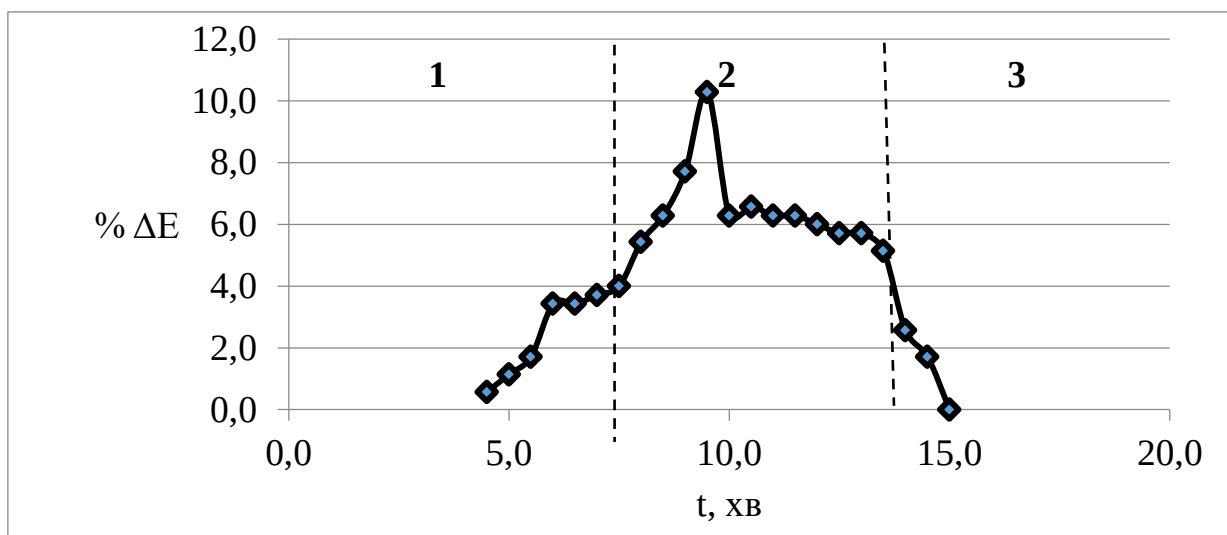


Рис. 4. Приклад еритрограми, побудованої за даними таблиці (контрольна проба) (Тарновська та ін., 2011).

Примітки: 1 – еритроцити першої групи стійкості (старі), 2 – еритроцити другої групи стійкості (молоді), 3 – еритроцити третьої групи стійкості.

7. Побудувати еритрограми в присутності тіаміну (30 мкг/мл), нікотинової кислоти (30 мкг/мл), піридоксину (30 мкг/мл), аскорбінової

кислоти (30 мкг/мл), CaCl_2 (10 мМ), ЕГТА (4 мМ) (зв'язує іони Ca^{2+}), додаючи їх у кювету із суспензією еритроцитів по 0,5 мл перед внесенням 0,004 н HCl .

8. Зробити висновки про стабілізуючий вплив вітамінів і антиоксидантів на резистентність еритроцитів.

Висновки: ...

Питання для контролю:

1. Охарактеризувати методи дослідження проникності біомембран.
2. Охарактеризувати процеси полегшеної (або прискореної) дифузії речовин у клітину. Переносники і транспортні білки.
3. Охарактеризувати активний транспорт через біомембрани молекул та іонів. Довести його кінетичні і термодинамічні особливості і переваги.
4. Охарактеризувати проникність біомембран для іонів. Визначити роль біомембран у її регуляції.
5. Охарактеризувати позитивний та негативний аномальний осмос.

Література до розділу:

1. Біофізика і біомеханіка : підруч. / В. С. Антонюк, М. О. Бондаренко, В. А. Ващенко та ін. – К.: НТУУ "КП", 2012. – С. 119 – 151.
2. Зима В.Л. Біофізика. Практикум: Навчальний посібник / В.Л. Зима, М.С. Мірошниченко, Т.Л. Давидовська, В.П. Ганчурін, Ю.І. Прилуцький. – К.: Видавничо-поліграфічний центр "Київський університет", 2003. – С. 57 – 62, 69 – 74.
3. Практикум з біофізики : навч. посіб. : [для студ. вищ. навч. закл.] / А.В. Тарновська, М.Б. Галан, Н.П. Головач, М.В. Бура, Д.І. Санагурський. – Львів : ЛНУ імені Івана Франка, 2011. – С. 47 – 48.
4. Тіманюк В. О. Біофізика: Підруч. для студ. вищ. навч. закл. / В. О. Тіманюк, О. М. Животова. – Х.: вид – во НФаУ; Золоті сторінки, 2003. – С. 347 – 375.

ТЕРМОДИНАМІКА БІОЛОГІЧНИХ ПРОЦЕСІВ. ВИЗНАЧЕННЯ СТАНДАРТНОЇ ВІЛЬНОЇ ЕНЕРГІЇ

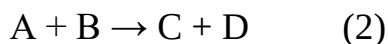
Біологічні об'єкти підпорядковуються законам термодинаміки, тому є можливість оцінювати енергетичний баланс у системі, а також напрям біологічних процесів. У біологічних системах більшість хімічних реакцій протікає при постійних температурах і тисках, тому здійснювану роботу можна охарактеризувати зміною вільної енергії Гіббса (ΔG). Об'єднання першого та другого законів термодинаміки дає змогу визначити ΔG як:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S, \quad (1)$$

де ΔH – зміна ентальпії, ΔS – зміна ентропії, T – температура.

Вільна енергія має низку важливих ознак, які ми можемо використовувати для характеристики хімічних перетворень у клітині. Якщо зміна вільної енергії для певної реакції від'ємна ($\Delta G < 0$), то така реакція протікає довільно. У цьому разі простежується виділення вільної енергії, і такий процес названо *екзергонічним*. Якщо реакція проходить зі збільшенням вільної енергії ($\Delta G > 0$), тобто їй необхідна додаткова енергія, то таку реакцію називають *ендергонічною*. У біологічних об'єктах зазвичай перебіг ендергонічних реакцій сполучено в проміжних стадіях з екзергонічними реакціями.

За величиною зміни вільної енергії Гібса визначають наближення реакції до стану рівноваги. У рівноважному стані $\Delta G = 0$. Можна застосувати положення рівноважної термодинаміки для вивчення хімічних перетворень. Розглянемо просту хімічну реакцію типу:



Таке перетворення при фіксованій температурі T і тиску P характеризується певною константою рівноваги:

$$K = \frac{[C]}{[A] \cdot [B]} \quad (3)$$

Наявний зв'язок між константою рівноваги і зміною вільної енергії Гібса ΔG у такому вигляді:

$$\Delta G = \Delta G^\circ + R \cdot T \cdot \ln K_p \quad (4)$$

де ΔG° – зміна стандартної вільної енергії, яку визначають при фіксованих умовах (температура, pH). У разі досягнення рівноваги $\Delta G = 0$ і тоді:

$$\Delta G^\circ = - R \cdot T \cdot \ln K_p \quad (5)$$

Очевидно, чим більша константа рівноваги, тим більше від'ємне значення стандартної вільної енергії.

Якщо в реакції, що розглядається, у початковий момент є 1 М речовини А і 1 М речовини В, а $\Delta G^\circ = -17\,133$ Дж/моль, тоді можна зробити висновок, що рівновага значно зміщена в напрямку утворення речовини С. Отже, у хімічних реакціях з великим зменшенням ΔG° рівноважна концентрація продуктів реакції значно переважає концентрацію реагентів.

У наступній роботі на прикладі однієї з простих реакцій буде доведено спосіб визначення константи рівноваги K_p і розрахунок за величиною зміни стандартної вільної енергії. Вибрано реакцію молочної кислоти $\text{CH}_3\text{-CHON-COOH}$ ($\text{H}_2\text{Лакт}$) з тривалентним залізом Fe^{+3} , оскільки в результаті такої реакції утворюється забарвлений продукт, який просто реєструється на фотоколориметрі. Формулу реакції записують так:



Константа рівноваги:

$$K_p = \frac{[\text{Fe}(\text{НЛакт})_n^{3-n}] \cdot [\text{H}^+]^n}{[\text{Fe}^{3+}] \cdot [\text{H}_2\text{Лакт}]^n} \quad (7)$$

Для знаходження K_p необхідно знати $[\text{H}^+]$, $[\text{Fe}(\text{НЛакт})_n^{3-n}]$, $[\text{Fe}^{3+}]$, $[\text{H}_2\text{Лакт}]$, тобто рівноважні концентрації вільної $\text{H}_2\text{Лакт}$, комплексу $\text{Fe}(\text{НЛакт})_n^{3-n}$, незакомплексованого заліза і координаційне число n .

Координаційне число n знаходимо за допомогою константи нестійкості $K_{\text{нест}}$ комплексу $\text{Fe}(\text{НЛакт})_n^{3-n}$:

$$K_{\text{нест}} = \frac{[\text{Fe}^{3+}] \cdot [\text{НЛакт}^-]^n}{[\text{Fe}(\text{НЛакт}^-)_n^{3-n}]} \quad (8)$$

Далі логарифмуємо формулу:

$$\lg K_{\text{нест}} = \lg \frac{[\text{Fe}^{3+}]}{[\text{Fe}(\text{НЛакт}^-)_n^{3-n}]} + n \lg [\text{НЛакт}^-] \quad (9)$$

$$\lg K_{\text{нест}} - \lg \frac{[\text{Fe}^{3+}]}{[\text{Fe}(\text{НЛакт}^-)_n^{3-n}]} - n \lg [\text{НЛакт}^-] = 0 \quad (10)$$

Якщо на осі ординат відкласти $\lg \frac{[\text{Fe}(\text{НЛакт}^-)_n^{3-n}]}{[\text{Fe}^{3+}]}$, а на осі абсцис – $\lg [\text{НЛакт}^-]$, тоді тангенс кута нахилу одержаної прямої при однаковому масштабі чисельно буде дорівнювати n . Концентрацію речовин визначають за допомогою фотоколориметра або спектрофотометра.

Лабораторна робота № 6

ВИЗНАЧЕННЯ КОНСТАНТИ РІВНОВАГИ І СТАНДАРТНОЇ ВІЛЬНОЇ ЕНЕРГІЇ ЗА КОНСТАНТОЮ РІВНОВАГИ

Мета: навчитися визначати константу рівноваги і стандартну вільну енергію.

Основні завдання:

1. Визначити константу рівноваги K_r .
2. Визначити стандартну вільну енергію за константою рівноваги.

Обладнання, апаратура, матеріали і реактиви:

1. Прилади: фотоколориметр або спектрофотометр.
2. Посуд, допоміжні знаряддя: хімічні склянки, мірні циліндри.
3. Реактиви: розчини молочної кислоти і $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$.

Приготування буферного розчину, рН 2: Розчин № 1 – 0,1 Н соляна кислота. Розчин № 2 – 7,507 г гліцину, 5,85 г хлориду натрію розчинити у воді, довести об'єм до 1 л, 519 мл розчину № 2 довести до 1 л розчином №1.

Питання для підготовки та обговорення:

1. Написати формулу та охарактеризувати зміну вільної енергії Гібса.
2. Які реакції називають ендергонічними, а які екзергонічними?
3. Яке можливе співвідношення між стандартною вільною енергією та константою рівноваги?
4. Написати формулу і потрактувати константу рівноваги.

Хід роботи.

1. Одержати криву залежності оптичної густини від загальної концентрації молочної кислоти при постійній концентрації Fe^{3+} і постійному рН. Загальна концентрація молочної кислоти має бути приблизно у 100 разів більша, ніж загальна концентрація тривалентного заліза.

2. До 1 мл 0,012 М розчину тривалентного заліза, налитого в колбу на 25 мл, додати певну кількість молочної кислоти (згідно з таблиці 9, де наведено залежність оптичної густини розчинів лактату заліза при рН 2 від концентрації молочної кислоти та будуть інші розрахунки) і розбавити розчин буфером (рН = 2) до 25 мл. Розчин перемішати та виміряти оптичну густину D на фотоколориметрі. Для вимірювання використати світлофільтр з $\lambda = 520$ нм і кювету товщиною 20 мм. Дані занести в таблицю 9.

3. На базі даних з таблиці 9 побудувати графік залежності оптичної густини D від концентрації молочної кислоти $[\text{H}_2\text{Лакт}]/100$ (рис. 5).

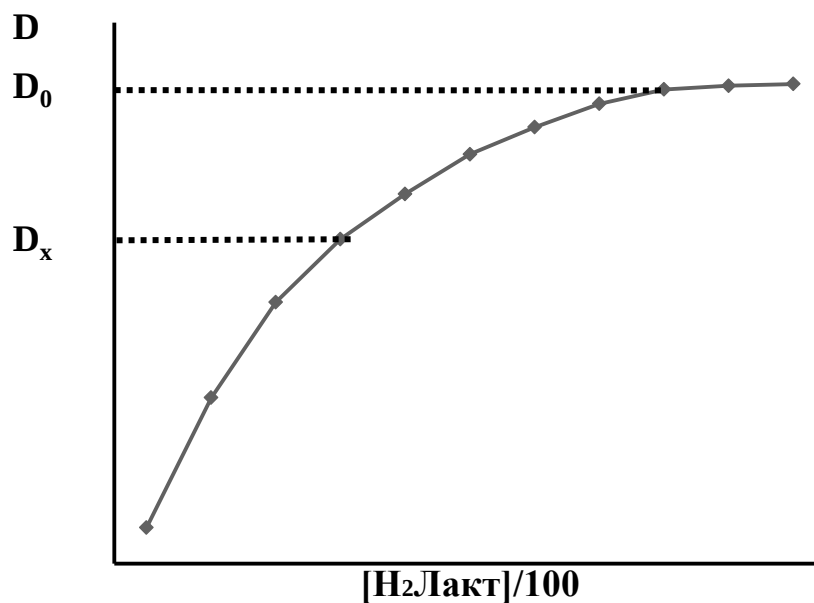


Рис. 5. Залежність оптичної густини D від концентрації молочної кислоти $[H_2\text{Лакт}]/100$ (Тарновська та ін., 2011).

Із рисунка видно, що крива залежності D від концентрації $H_2\text{Лакт}$ має горизонтальну ділянку. Наявність горизонтальної ділянки на кривій, отриманій у цих умовах ($pH = \text{const}$, $[Fe^{3+}] = \text{const}$, $[Fe^{3+}] \ll [H_2\text{Лакт}]$), дає змогу стверджувати, що відбулося практично повне зв'язування центрального іона Fe^{3+} у комплексі $[Fe(H\text{Лакт})_n]^{3-n}$.

Таблиця 9.

№	0.1 М $H_2\text{Лакт}$, мл	$[H_2\text{Лакт}] / 100$, М	D_x	$D_0 - D_x$	$D_x / (D_0 - D_x)$	$-\lg [H_2\text{Лакт}]$	$\lg (D_x / (D_0 - D_x))$
1	0,1						
2	0,5						
3	1,0						
4	2,0						
5	5,0						
6	6,0						
7	10,0						
8	15,0						
9	17,0						
10	20,0						

4. Оптичну густину розчину при досягненні горизонтальної ділянки позначити через D_0 , а оптичну густину при тій чи іншій концентрації $H_2\text{Лакт}$, коли ще немає повного зв'язування заліза в комплекс, позначити через D_x . Оскільки оптична густина пропорційна концентрації забарвленого комплексу, то:

$$\frac{[\text{Fe}(\text{НЛакт}^-)_n]^{3-n}}{[\text{Fe}^{3+}]} = \frac{D_x}{D_0 - D_x} \quad (11)$$

тоді можна провести заміну у формулі (10), підставивши вираз (11), де концентрації речовин позначено як оптичні густини. Потім виконати необхідні обчислення, одержані дані занести в таблицю 9 і побудувати графік залежності $\lg \frac{D_x}{D_0 - D_x}$ від $-\lg [\text{H}_2\text{Лакт}]$, знайти величину n (рис. 6), де $n = \tg \alpha$.

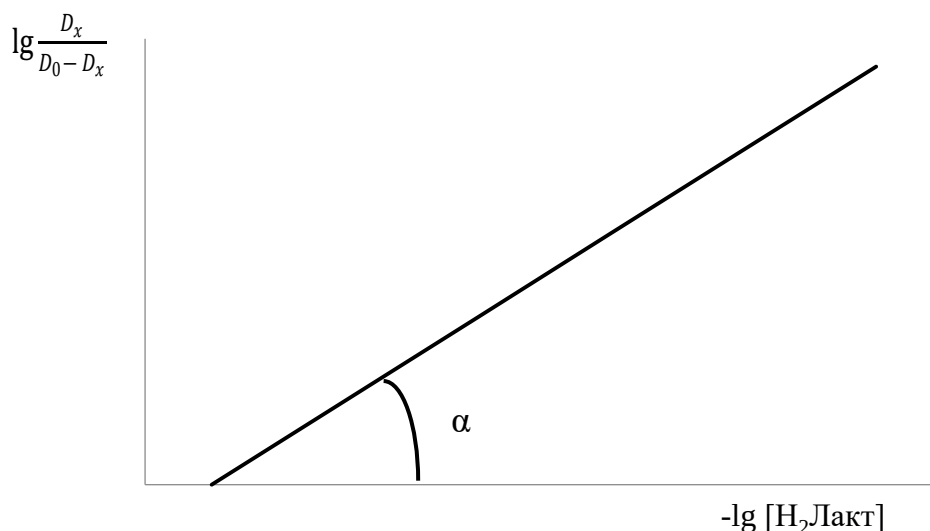


Рис. 6. Графічне знаходження координаційного числа n , ($\tg \alpha = n$) (Тарновська та ін., 2011)..

5. Зі значення $pH = 2$ знаходимо, що $[H] = 10^{-2}$. Для розрахунку константи рівноваги Kp використати наступне:

$$[\text{H}_2\text{Лакт}] = C_{\text{заг}} - [\text{Fe}(\text{НЛакт}^-)_n]^{3-n} - [\text{НЛакт}^-] - [\text{Лакт}^{2-}] \quad (12)$$

де $C_{\text{заг}}$ – загальна концентрація молочної кислоти. Оскільки $pH = 2$, а $\text{H}_2\text{Лакт}$ – слабка кислота, то $[\text{НЛакт}^-]$ і, тим більше, $[\text{НЛакт}^{2-}]$ настільки малі, що ними можна знехтувати. Якщо $n[\text{Fe}(\text{НЛакт}^-)_n]^{3-n} \ll [\text{H}_2\text{Лакт}]$, тоді $[\text{H}_2\text{Лакт}] \approx C_{\text{заг}}$.

Підставивши у формулу (7) відповідні значення, матимемо:

$$Kp = \frac{D_x [H^+]^{\tg \alpha}}{(D_0 - D_x) (C_{\text{заг}})^{\tg \alpha}} \quad (13)$$

де $C_{\text{заг}}$ – концентрація молочної кислоти для величини D_x .

6. Для визначення стандартної вільної енергії ΔG° за константою рівноваги K_r використати формулу (5).

Висновки: ...

Питання для контролю:

1. Як називається термодинамічна система, яка обмінюється з довкіллям речовиною і енергією?
2. В чому схожість між термодинамічною рівновагою та стаціонарним станом?
3. Що таке вільна енергія системи?
4. Що відображає ентальпія?
5. Що визначається об'єднаним записом першого і другого законів термодинаміки?

Література до розділу:

1. Біофізика і біомеханіка : підруч. / В. С. Антонюк, М. О. Бондаренко, В. А. Ващенко та ін. – К.: НТУУ "КПІ", 2012. – С. 72 – 86.
2. Зима В.Л. Біофізика. Практикум: Навчальний посібник / В.Л. Зима, М.С. Мірошніченко, Т.Л. Давидовська, В.П. Ганчурін, Ю.І. Прилуцький. – К.: Видавничо-поліграфічний центр "Київський університет", 2003. – С. 39 – 46.

МІГРАЦІЯ ЕНЕРГІЇ В БІОЛОГІЧНИХ СИСТЕМАХ

Добре відомо, що видиме світло звичайно не впливає істотно на клітини і тканини тварин. Однак якщо в розчині одночасно з клітинами знаходяться деякі барвники (еритрозин, еозин, бенгальська троянда, метиленовий синій та інші), які у даному випадку виконують функції звичайного пігменту, освітлення може привести до ушкодження і загибелі клітин. Це явище має назву *фотодинамічного ефекту*. В основі його лежить реакція фотоокислювання білків за рахунок поглиненої барвником світлової енергії.

Який механізм цього явища?

При поглинанні кванта світла (кванта променистої енергії) молекула переходить у збуджений стан, у якому електрони атомних груп, що поглинули енергію, переходять на більш високі енергетичні рівні. Тривалість життя такого збудженого стану звичайно не перевищує $10^{-9} - 10^{-8}$ секунд. Частина цієї енергії в деяких молекулах виділяється у виді випромінювання. Це явище називається флуоресценцією. Відповідно до правила Стокса смуга флуоресценції завжди лежить в області більш довгих хвиль, ніж спектр поглинання.

Енергія, акумульована молекулами барвника, може мігрувати за допомогою індуктивного механізму на білки плазматичних мембран клітин і викликати їх збудження. Молекули, що знаходяться в збудженому стані, мають звичайно більш високу реакційну здібність. Це пояснюється тим, що при збудженні відбувається перехід електрона на більш високий рівень, у результаті чого порушується взаємна компенсація спинів збудженого електрона і другого електрона пари. Тому збуджений електрон легше відірвати від молекули при дії електрофільного агента (електроакцепторної молекули). у зв'язку з тим, що час флуоресценції окремого атома складає близько 10^{-9} секунд, а тривалість між зіткненнями молекули близько 10^{-12} секунд, то за час збудженого стану може відбутися до 10^3 зіткнень з більш високою ймовірністю хімічної реакції. Зокрема, дуже полегшуються реакції окислювання (фотосенсибілізоване окислювання).

Природно, що антиокислювачі істотно знижують інтенсивність цього процесу (гіпосульфит, цистеїн, глутатіон і т. п.).

Лабораторна робота № 7

ДОСЛІДЖЕННЯ ГЕМОЛІЗУ ЕРИТРОЦИТІВ ЗА ДІЇ ОСВІТЛЕННЯ В ПРИСУТНОСТІ ЕРИТРОЗИНА

Мета: визначити ступінь прояву фотодинамічного ефекту у еритроцитів за різних умов навколишнього середовища.

Основні завдання:

1. Визначити роль еритрозину, як пігмента, у процесі реалізації дії опромінення на стан мембран еритроцитів.

Обладнання, апаратура, матеріали і реактиви:

1. Прилади: фотоколориметр або спектрофотометр, термостат, лампа потужністю 500 Вт для опромінення.
2. Посуд, допоміжні знаряддя: пробірки, піпетки, мірні циліндри.
3. Реактиви: еритрозин (0,04 %), сульфат міді (II) для створення світлофільтру, фізіологічний розчин.
4. Матеріали: еритроцити.

Питання для підготовки та обговорення:

1. Надати характеристику фотодинамічного ефекту.
2. Охарактеризувати типи пігментів?
3. Описати механізми міграції енергії у біосистемах?
4. Надати характеристики фотобіологічним процесам та охарактеризуйте їх стадії. Наведіть приклади реакцій.
5. Охарактеризувати механізми фотосенсибілізації та фотозахисту.

Хід роботи.

1. У процесі гемолізу еритроцитів відбувається збільшення світлопропускання суспензії. Це явище може служити мірою гемолізу. Світлопропускання суспензії еритроцитів можна вимірити на фотоелектроколориметрі (ФЕК-54 або іншої марки), а також на візуальному колориметрі типу КОЛ-1. Виміри роблять з червоним світлофільтром, тобто в спектральній області, де гемоглобін не поглинає.

2. У дві пробірки налити по 10 мл розчину еритрозину (0,04 % розчин) і додати у кожен по 0,1 мл 1 % суспензії еритроцитів (проби 1 і 2). У дві інші пробірки (контрольні) налити по 10 мл фізіологічного розчину і по 0,1 мл суспензії еритроцитів (проби 3 і 4).

3. Пробірки кілька разів струсити, проби 2 і 4 помістити у темну камеру, а проби 1 і 3 освітлюють протягом 10 хвилин. Пробірки, які освітлюють, потрібно помістити на відстань 25 см від лампи (500 Вт), установивши посередині плоску скляну судину з розчином CuSO_4 (для того, щоб виключити гемоліз за дією інфрачервоного випромінювання лампи).

4. Після освітлення пробірки 1 і 3 також помістити у темну камеру.

5. Потім через 15 хвилин зробити вимір світлопропускання всіх проб. Отримані результати занести у таблицю 10:

Таблиця 10.

№ проби:	Умови досліду	:15	:30	:45	:60	:75	хвилин
1.	Еритроцити + барвник + освітлення						
2.	Еритроцити + барвник						
3.	Еритроцити + освітлення						
4.	Еритроцити						

6. За отриманими даними побудувати графіки.

Висновки: ...

Лабораторна робота № 8

ВПЛИВ АНТИОКСИДАНТІВ НА ФОТОДИНАМІЧНИЙ ГЕМОЛІЗ ЕРИТРОЦИТІВ

Мета: визначити дію антиокиснювачів на ступінь прояву фотодинамічного ефекту у еритроцитів.

Основні завдання:

Визначити роль гіпосульфиту натрію та аскорбінової кислоти на ступінь пошкодження еритроцитів за дією освітлення у присутності еритрозину.

Обладнання, апаратура, матеріали і реактиви:

1. Прилади: фотоколориметр або спектрофотометр, термостат, лампа потужністю 500 Вт для опромінення.
2. Посуд, допоміжні знаряддя: пробірки, піпетки, мірні циліндри.
3. Реактиви: еритрозин (0,04 %), сульфат міді (II) для створення світлофільтру, фізіологічний розчин, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,11 М), аскорбінова кислота (0,11 М).
4. Матеріали: еритроцити.

Питання для підготовки та обговорення:

1. Пояснити, чому смуга флуоресценції знаходиться в більш довгохвильовій частині спектра, ніж смуга поглинання.
2. Пояснити фізичні процеси, що призводять до утворення вільних радикалів в організмі.
3. На які молекули біополімерів в основному впливають вільні радикали?
4. Пояснити механізм дії антиоксидантів у досліді.

Хід роботи.

Як уже вказувалося вище, на фотоокислювання білків, а, таким чином, і на гемоліз еритроцитів можна істотно впливати, додаючи в розчин речовини антиокисного характеру. Одним з найбільш доступних речовин такого типу є гіпосульфит натрію ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$).

1. У 4 пробірки налити по 9 мл 0,04 % розчину еритрозину у фізіологічному розчині і по 0,1 мл 1 % суспензії еритроцитів.
2. У 2 пробірки (проби 1 і 2) додати по 1 мл розчину $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, (0,11 М); в дві інші (проби 3 і 4) – додати по 1 мл фізіологічного розчину.
3. Проби 1 і 3 освітлити, а проби 2 і 4 тримати у темряві. Відразу після освітлення (10 хв.), а потім кожні 15 хвилин, виміряти світлопоглинання всіх проб на фотоелектроколориметрі КФК-2.
4. Результати вимірів занести у таблицю 11, а потім побудувати графік.

Таблиця 11.

№ проби:	Умови досліджу:	15	:30	:45	:60	:75 хвилин
1.	Еритроцити + барвник + $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ + освітлення					
2.	Еритроцити + барвник + $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$					
3.	Еритроцити + барвник + + освітлення + фізіологічний розчин					
4.	Еритроцити + барвник + + фізіологічний розчин					

Висновки: ...

Питання для контролю:

1. Охарактеризувати процеси міграції енергії та їх основні риси.
2. Охарактеризувати процеси міграції енергії у фізичних і хімічних процесах.
3. Охарактеризувати резонансний і електронний типи міграції енергії.
4. Охарактеризувати індуктивний тип міграції енергії.
5. Охарактеризувати процеси міграції енергії у біологічних системах.
6. Охарактеризувати фізичні та хімічні фази фотопроцесів.

Література до розділу:

1. Костюк П.Г. Биофизика / П.Г. Костюк, Д.М. Гроздинский, В.Л. Зима и др. – Киев: Вища школа, 1989. – С. 341 – 351.
2. Методичні вказівки для самостійної роботи студентів, лабораторні роботи та завдання із курсу біофізики (Для студентів біологічного факультету усіх форм навчання) / О.В. Запорожченко, Л.М Карпов, С.А. Петров, О.К. Будняк, Н.Л. Федорко. – Одеса, 2003. – С. 22 – 24.

ЗМІСТОВИЙ МОДУЛЬ III. КВАНТОВА ТА МОЛЕКУЛЯРНА БІОФІЗИКА

МОЛЕКУЛЯРНА БІОФІЗИКА.

СПЕКТРИ ПОГЛИНАННЯ БІЛКІВ І НУКЛЕЙНОВИХ КИСЛОТ

У сучасній біології широке застосування знаходять спектральні методи вивчення біологічних об'єктів. Важливу інформацію про структурні особливості біополімерів одержують при використанні флуоресценції, ультрафіолетової (УФ) та інфрачервоної (ІЧ) спектрофотометрії, дисперсії оптичного обертання, електронного парамагнітного резонансу (ЕПР) і ядерного магнітного резонансу (ЯМР).

Основним законом абсорбційної спектрофотометрії є закон Ламберта – Бера. Якщо на шар речовини товщиною $l = 1$ см падає монохроматичний пучок світла інтенсивністю I_0 , то завдяки процесам поглинання світла в речовині, світло, що вийшло, буде мати інтенсивність:

$$I = I_0 e^{-\epsilon Cl},$$

де C – концентрація речовини; ϵ – молярний коефіцієнт екстинкції ($M^{-1} \cdot cm^{-1}$).

Логарифм співвідносини I_0 / I називається оптичною щільністю речовини:

$$D = \lg I_0 / I = \epsilon Cl.$$

Пропускання речовини (T) виражається співвідношенням:

$$T = I / I_0 \cdot 100 \%,$$

$$D = \lg 1/T.$$

Світло різних довжин хвиль λ поглинається речовиною по-різному. Залежність оптичної щільності D або молярного коефіцієнта екстинкції ϵ від λ називається спектром поглинання речовини: $D = f(\lambda)$ або $\epsilon = f(\lambda)$. Спектр поглинання визначається властивостями речовини і є постійною характеристикою речовини.

Прилади, на яких вимірюються D або T та знімаються спектри поглинання, називаються спектофотометрами.

Речовини можуть поглинати світло в різних ділянках спектра. Умовно весь спектральний діапазон поділяють на ультрафіолетову, видиму й інфрачервону області. УФ-спектр лежить в інтервалі λ від 100 до 400 нм і розділяється на вакуумну (100 – 200 нм), середню (200 – 300 нм) і близьку (300 – 400 нм) УФ-області (1 нм = 10^{-9} м). Видима частина спектру займає інтервал від 400 до 750 нм. ІЧ-спектр поділяється на близьку (0,75 – 2,5 мкм), середню (2,5 – 15 мкм) і далеку (15 – 300 мкм) ІЧ-області.

Спектри поглинання білків і нуклеїнових кислот розташовані в середній частині УФ-спектру. Чисто емпірично знайдені кореляції між хімічною структурою молекул і їхніми спектрами. Наявність циклічних структур з делокалізованими π - електронами обумовлює поглинання УФ-світла. Для білків і нуклеїнових кислот характерні два максимуми поглинання: один – на межі вакуумної УФ-області (200 – 210 нм) і другий – у середній УФ-області (довгохвильовий максимум поглинання).

Довгохвильовий максимум білків визначається поглинанням трьох ароматичних амінокислот – триптофану, тирозину і фенілаланіну. Поглинання обумовлене $\pi - \pi^*$ електронними переходами в площині ароматичного кільця. Для нуклеїнових кислот максимум 260 нм пов'язаний з поглинанням пуринових та піримідинових основ. Основна частка поглинання пов'язана з $\pi - \pi^*$ переходами, але невелике поглинання визначається і гетероатомами, що дають $n - \pi^*$ переходи.

У лабораторній практиці на спектрофотометрі визначають відношення D_{280} / D_{260} . По цьому відношенню оцінюють чистоту білкових препаратів і відсутність нуклеїнових кислот. Якщо $D_{280} / D_{260} > 1,6 - 1,7$ – це свідчить про високу чистоту білкових препаратів.

УФ-поглинання білків. В області далекого, вакуумного, ультрафіолету поглинають світло всі амінокислоти, а також пептидні зв'язки. В області 240 – 300 нм поглинають тільки ароматичні амінокислоти: триптофан, тирозин, фенілаланін (слабке поглинання дають гістидин і цистеїн).

При включенні амінокислот у структуру білка їхні спектри поглинання не дуже змінюються. Тому оптична щільність білка (D^b) дорівнює сумі оптичних щільностей триптофану ($D^{три}$), тирозину ($D^{тир}$) і фенілаланіну ($D^{фен}$):

$$D^b = D^{три} + D^{тир} + D^{фен}$$

При зміні рН розчину найбільші зміни перетерплює спектр поглинання тирозину. У лужній області рН тирозин переходить в іонізовану форму – тирозинат. Спектр поглинання тирозинатів відрізняється від спектру поглинання тирозину. Він розташований у довгохвильовій області з максимумом при 294 нм.

Спектрофотометрія дозволяє визначати кількість тирозинових і триптофанових залишків у білках. У нейтральних розчинах поглинання білка при 280 нм представляється як сума оптичних щільностей тирозину і триптофану. У зв'язку з тим, що максимуми спектрів поглинання цих амінокислот майже збігаються, виміряти вміст цих амінокислот у білку при нейтральних рН важко. У лужному середовищі (при рН > 12) спостерігається спектральний поділ триптофанового і тирозинового поглинання. На цій

підставі Гудвин і Мортон запропонували метод визначення вмісту тирозинових і триптофанових залишків у білку.

Береться розчин білка з відомою молярною концентрацією C в 0,1 Н лугу. За допомогою спектофотометру знаходиться оптична щільність білка на двох довжинах хвиль 280 нм та 294 нм і потім визначаються молярні коефіцієнти екстинкції (ϵ):

$$\epsilon_{280} = D_{280} / Cl \text{ і } \epsilon_{294} = D_{294} / Cl,$$

де l – товщина кювети. За методом Гудвина і Мортон, число моль тирозину ($M^{\text{тир}}$) і триптофану ($M^{\text{трип}}$) на моль білка буде дорівнювати:

$$M^{\text{тир}} = 10^{-3} (0,592 \epsilon_{294} - 0,263 \epsilon_{280});$$

$$M^{\text{трип}} = 10^{-3} (0,263 \epsilon_{280} - 0,170 \epsilon_{294}).$$

Для спектрів білків характерно, що в області довжин хвиль $\lambda > 310$ нм оптичне поглинання відсутнє. Наявність поглинання в ближній УФ-області свідчить про існування світлорозсіюючих агрегатів білкових молекул. Особливо це характерно для білків, які у фізіологічних умовах агрегують (міозин, тропоміозин та ін.). При наявності компонента, що розсіює, спектр поглинання білка змінюється. Тому необхідно знати метод розрахунку розсіювання і виправлення спектра поглинання.

У загальному випадку оптичну щільність можна представити як суму внесків дійсного поглинання (D_n) і розсіювання (D_p):

$$D = D_n + D_p$$

Теорія розсіювання світла для випадку, коли розсіюючі частки мають розмір, порівняний з довжиною хвилі світла (λ) або більше її, була розроблена Релеєм. Тому таке розсіювання має назву *релеєвського розсіювання* й описується рівнянням:

$$D_p = B / \lambda^n$$

де B і n – постійні. Постійна n залежить від розміру і форми часток, що розсіюють, і змінюється в межах від 2 до 4. Логарифмуючи це рівняння, одержимо лінійну залежність між $\lg D_p$ і $\lg \lambda$:

$$\lg D_p = \lg B - n \lg \lambda$$

Практично розрахунок світлорозсіювання проводиться таким чином:

- Знімають спектр поглинання білка в широкій області і будують графік залежності оптичної щільності від довжини хвилі світла (рис. 7, крива 1). Якщо в ділянці $\lambda > 310$ нм графіка має місце велика величина оптичної щільності, це свідчить про наявність світлорозсіюючих часток.

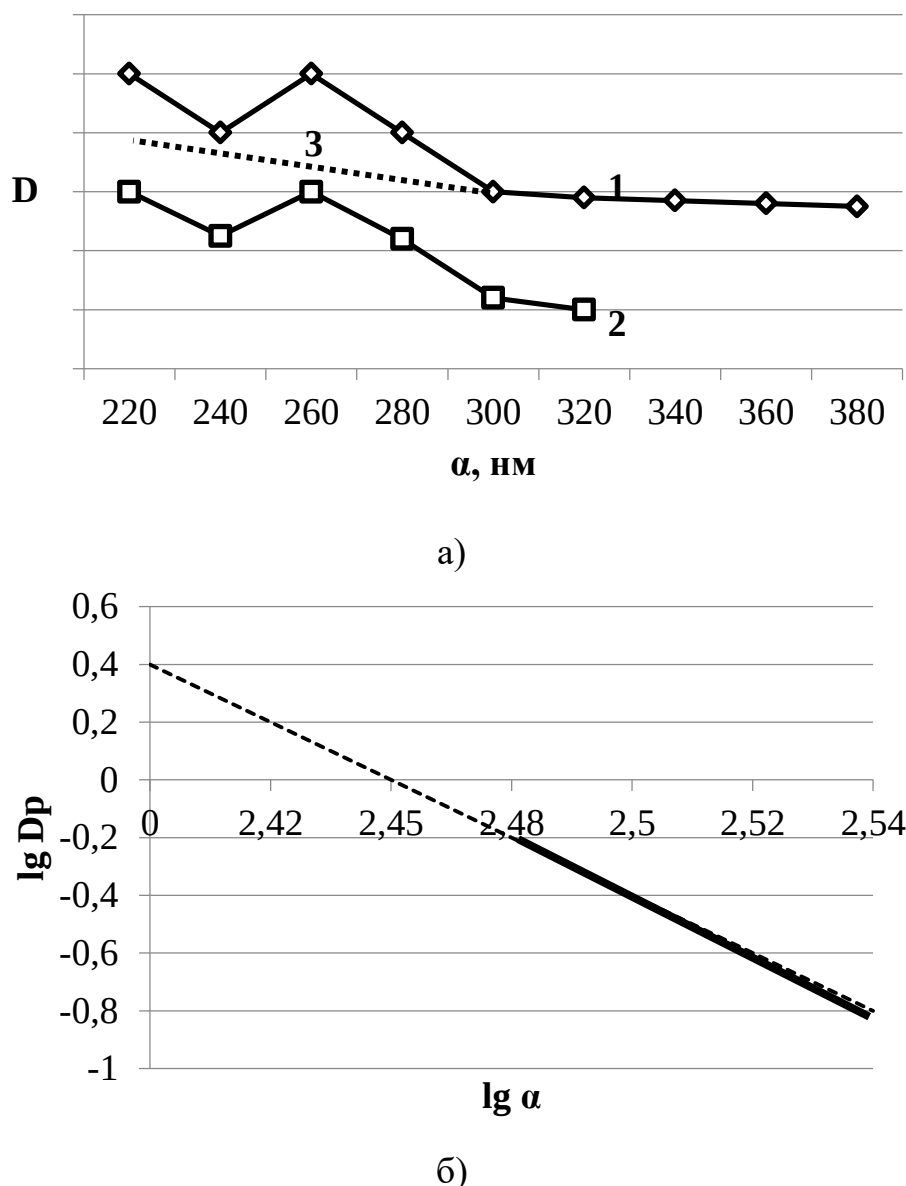


Рис. 7. Графічний метод урахування світлорозсіювання у спектрах поглинання білкових розчинів: а – сумарний спектр поглинання (1), світлорозсіювання (2) й істинний спектр поглинання білка (3); б – залежність оптичної густини від довжини хвилі в логарифмічному масштабі (Тарновська та ін., 2011).

- Знаходять залежність $\lg D_p$ від $\lg \lambda$ в ділянці від 310 до 360 нм і будують графік (рис. 7б), лінійна залежність на якому буде свідчити про наявність релеєвського світлорозсіювання.

- Проводять екстраполяцію цієї залежності в області спектра, де розташований спектр поглинання білка (рис. 7б, пунктирна лінія); знаходять антилогарифми від $\lg D_p$, які дають відповідні величини D_p в області поглинання білка (рис. 7а, крива 2).

- Справжній спектр поглинання даного білка знаходиться вирахуванням із значень кривої 1 значень кривої 2 (будують криву 3).

Взагалі, ймовірність розсіювання є на 3-4 порядки меншою за ймовірність абсорбції. Тому інтенсивність розсіяного світла є значно меншою за інтенсивність "падаючого" випромінювання. З цієї причини в основному законі світлопоглинання (законі Бугера-Ламберта-Бера) часто нехтують розсіюванням і вважають, що зменшення інтенсивності випромінювання відбувається лише за рахунок поглинання, хоча насправді частина світла, яка потрапляє на розчин забарвленої речовини, розсіюється.

УФ-поглинання нуклеїнових кислот. Поглинання нуклеїнових кислот обумовлено пуриновими і піримідиновими основами. Значення $E_{\max}$ при 260 нм для аденіна, урацила, тиміна, гуаніна і цитозина дорівнює відповідно $13,4 \cdot 10^3$; $8,2 \cdot 10^3$; $7,4 \cdot 10^3$; $7,2 \cdot 10^3$ і $5,55 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Денатурація ДНК супроводжується різким зростанням оптичної щільності при 260 нм. Це явище називається *гіперхромним ефектом*. Залежність оптичної щільності D_{260} від температури називається кривою плавлення ДНК. За допомогою кривої плавлення виявляються важливі характеристики ДНК. Визначається гіперхромний ефект (Г.Е.) у відсотках:

$$\text{Г.Е.} = ((D_d - D_n) / D_n) \cdot 100 \%,$$

де D_d і D_n – оптичні щільності денатурованої і нативної ДНК.

Гіперхромний ефект збільшується при збільшенні довжини ланцюга. В залежності від препаратів ДНК гіперхромний ефект дає збільшення оптичної щільності від 20 до 60 %. За допомогою кривої плавлення визначається інтервал плавлення (ΔT) і температура плавлення ДНК (T_n). Денатурація ДНК спостерігається у вузькому інтервалі температур, що свідчить про високу кооперативність процесу. Величина ΔT відображає гетерогенність ДНК за складом і зменшується при наявності денатурованих ділянок.

Препарати ДНК із різних типів клітин характеризуються різною температурою плавлення. Експериментально було показано, що T_n лінійно залежить від кількості Г – Ц пар в ДНК. Мармур і Доти запропонували формулу, що зв'язує вміст Г – Ц пар у ДНК (δ) із T_n (T_n , як правило, не залежить від молекулярної маси ДНК):

$$\delta = 2,44 T_n - 834 (\%)$$

При охолодженні нагрітих зразків ДНК оптична щільність зменшується. Це – *гіпохромний ефект*. Відновлення комплементарної спіральної структури ДНК називається *ренатурацією*. Для того, щоб перевірити, чи відбулася ренатурація ДНК, розчин, що містить ДНК, нагрівають вдруге. Якщо гіперхромний ефект є таким же різким, з тим же інтервалом плавлення, тоді вважають, що ренатурація була повною. Якщо перехід розмитий у великому інтервалі температур, то відбулося неспецифічне спарювання основ.

Таким чином, УФ-спектрофотометрія в багатьох випадках є простим методом для вивчення структурної організації білків і нуклеїнових кислот.

Лабораторна робота № 9

ВИЗНАЧЕННЯ СПЕКТРІВ ПОГЛИНАННЯ АМІНОКИСЛОТ, БІЛКІВ І НУКЛЕЙНОВИХ КИСЛОТ

Завдання 1. Вимірювання спектрів поглинання ароматичних амінокислот.

Мета: засвоїти методику дослідження спектрів поглинання ароматичних амінокислот у розчинах за допомогою спектрофотометра СФ-26.

Основні завдання:

1. Виміряти спектри поглинання ароматичних амінокислот.
2. Знайти молярні коефіцієнти екстинкції триптофану, тирозину, фенілаланіну.
3. Перевірити справедливість закону Ламберта-Бера.
4. Порівняти спектри поглинання ароматичних амінокислот у їх лужних та нейтральних розчинах.

Обладнання, апаратура, матеріали і реактиви:

1. Прилади: спектрофотометр СФ-26.
2. Посуд, допоміжні знаряддя: звичайні пробірки, піпетки, хімічні склянки, штативи для пробірок.
3. Реактиви: розчини ароматичних амінокислот тирозину, фенілаланіну і триптофану.

Питання для підготовки та обговорення:

1. Охарактеризувати суть закону Ламберта-Бера?
2. Що таке «оптична густина»?
3. Надати визначення виразу «спектр поглинання речовини».

Хід роботи.

1. Приготувати розчин у воді триптофану 0,0147 мг/мл, тирозину 0,053 мг/мл і фенілаланіну 0,352 мг/мл та зняти їхні спектри поглинання в ділянці від 210 до 320 нм через 5 нм.

2. За одержаними значеннями оптичної густини D знайти молярні коефіцієнти екстинкції триптофану, тирозину, фенілаланіну на 250 і 280 нм. Молекулярні маси триптофану – 204,2, тирозину – 181,2 і фенілаланіну – 165,2 Да.

3. Приготувати розчини триптофану у воді в концентраціях 0,00735; 0,0147; 0,22 і 0,249 мг/мл і перевірити справедливість закону Ламберта-Бера.

4. Приготувати розчин триптофану і тирозину в 0,1 Н NaOH, зареєструвати спектри поглинання і порівняти зі спектрами поглинання нейтральних розчинів у воді.

Висновки: ...

Завдання 2. Вимірювання спектрів поглинання білків.

Мета: засвоїти методику дослідження спектрів поглинання і визначення концентрації білків у розчинах за допомогою спектрофотометра СФ-26.

Основні завдання:

1. Виміряти спектри поглинання білків.
2. Перевірити справедливість закону Ламберта-Бера.
3. Визначити кількість триптофанових і тирозинових залишків за формулами.
4. Врахувати внесок релеєвського розсіювання у спектрі поглинання актоміозину та знайти його істинний спектр поглинання.

Обладнання, апаратура, матеріали і реактиви:

1. Прилади: спектрофотометр СФ-26.
2. Посуд, допоміжні знаряддя: звичайні пробірки, піпетки, хімічні склянки, штативи для пробірок.
3. Реактиви: розчини білків (трипсин, рибонуклеаза, актоміозин).

Питання для підготовки та обговорення:

1. В якій ділянці лежать спектри поглинання білків?
2. Охарактеризувати УФ-поглинання білків.

Хід роботи.

1. Приготувати розчини білків у концентраціях 0,1; 0,2; 0,4 і 0,6 мг/мл – трипсину (білка, що містить триптофан), рибонуклеази (білка, що містить тирозин) і актоміозину (білкового комплексу, що розсіює світло).
2. Зареєструвати спектри цих білків, порівняти їх.
3. Перевірити справедливість закону Ламберта-Бера для білкових розчинів.
4. Знайти співвідношення D_{280} / D_{260} .
5. Для трипсину визначити кількість триптофанових і тирозинових залишків ($M^{\text{трип}}$ та $M^{\text{трип}}$) за відповідними формулами. Молекулярна маса трипсину – 23 000.
6. Врахувати внесок релеєвського розсіювання у спектрі поглинання актоміозину за допомогою формули (прийняти $B=3$, $n=4$). Знайти істинний спектр поглинання актоміозину.

Висновки: ...

Завдання 3. Вимірювання спектрів поглинання нуклеїнових кислот.

Мета: засвоїти методику дослідження спектрів поглинання і визначення концентрації нуклеїнових кислот у розчинах за допомогою спектрофотометра СФ-26.

Основні завдання:

1. Виміряти спектри поглинання нуклеїнових кислот.
2. Визначити співвідношення D_{280} / D_{260} .

Обладнання, апаратура, матеріали і реактиви:

1. Прилади: спектрофотометр СФ-26 або СФ-46.
2. Посуд, допоміжні знаряддя: звичайні пробірки, піпетки, хімічні склянки, штативи для пробірок.
3. Реактиви: розчин ДНК.

Питання для підготовки та обговорення:

1. Охарактеризувати УФ-поглинання нуклеїнових кислот.
2. Описати різницю між спектрами поглинання білків та нуклеїнових кислот?

Хід роботи.

1. Приготувати 3-4 мл розчину ДНК у 0,15 М NaCl розведенням концентрованого розчину або розчиненням сухого препарату комерційної ДНК. Добитися, щоб D_{260} становила 0,5-0,6 (концентрація ДНК 0,20-0,25 мкг/мл).
2. Виміряти спектр поглинання в ділянці 220-300 нм.
3. Визначити співвідношення D_{280} / D_{260} .

Висновки: ...

Завдання 4. Визначення гіперхромного і гіпохромного ефекту нуклеїнових кислот різного походження

Мета: засвоїти методику визначення і розраховування гіпер- та гіпохромних ефектів нуклеїнових кислот у розчинах за допомогою спектрофотометра СФ-26.

Основні завдання:

1. Визначити гіпер- та гіпохромний ефект ДНК.

Обладнання, апаратура, матеріали і реактиви:

1. Прилади: спектрофотометр СФ-26.
2. Посуд, допоміжні знаряддя: звичайні пробірки, піпетки, хімічні склянки, штативи для пробірок.
3. Реактиви: розчини ДНК.

Питання для підготовки та обговорення:

1. Чим обумовлена первинна структура нуклеїнових кислот?
2. Чим обумовлена вторинна і третинна структура нуклеїнових кислот?
3. Описати молекулярний механізм гіперхромного ефекту?

4. Що таке гіпохромний ефект та ренатурація ДНК?
5. Охарактеризувати спектри поглинання білків та нуклеїнових кислот.

Хід роботи.

1. У 6 пробірок налити: у першу, другу і третю – по 4 мл 0,002 % розчину ДНК селезінки бика в 0,2 М розчині NaCl, у четверту, п'яту і шосту – по 4 мл 0,002 % розчину ДНК із гороху посівного в 0,2 М розчині NaCl.
2. Заміряти екстинкцію всіх проб на спектрофотометрі СФ-46 при довжині хвилі 260 нм.
3. Потім другу і п'яту пробірки поставити у терморегульовану водяну баню при 50 °С на 10 хвилин, а 3 і 6 – кип'ятити протягом 10 хвилин. Усі проби спектрофотометрувати.
4. Потім всі пробірки охолодити під струмом води до кімнатної температури і через 10 хвилин знову спектрофотометрувати.

5. Дані занести у таблицю 12:

Таблиця 12.

Варіант	Тваринна ДНК		Рослинна ДНК	
	50 °С	100 °С	50 °С	100 °С
Нативна ДНК				
Нагрівання				
Охолодження				

6. Гіперхромний і гіпохромний ефекти обчислити за формулами:

$$\text{Гіпер. Е.} = \frac{E_{\text{ДНК нагр}} - E_{\text{ДНК натив}}}{E_{\text{ДНК натив}}} \cdot 100 \%$$

$$\text{Гіпо. Е.} = \frac{E_{\text{ДНК нагр}} - E_{\text{ДНК охолодж}}}{E_{\text{ДНК охолодж}}} \cdot 100 \%$$

Висновки: ...

Питання для контролю:

1. Що таке дисперсія оптичного обертання білків?
2. Чому білок поглинає ультрафіолет?
3. Охарактеризувати круговий дихроїзм білків.
4. Охарактеризувати закон Стокса.
5. Охарактеризувати біофізичні властивості нуклеїнових кислот.
6. Охарактеризувати гіпер- та гіпохромні ефекти нуклеїнових кислот.

7. Охарактеризувати різні конформації нуклеотидних компонентів нуклеїнових кислот.

Література до розділу:

1. Зима В.Л. Біофізика. Практикум: Навчальний посібник / В.Л. Зима, М.С. Мірошніченко, Т.Л. Давидовська, В.П. Ганчурін, Ю.І. Прилуцький. – К.: Видавничо-поліграфічний центр "Київський університет", 2003. – С. 97 – 106.

2. Терещенко М.Ф. Біофізика: підручник / М. Ф.Терещенко, Г. С. Тимчик, І. О. Яковенко. - Київ: КПІ ім. Ігоря Сікорського, Вид-во «Політехніка», 2019. – С. 295 – 300.

3. Тіманюк В. О. Біофізика: Підруч. для студ. вищ. навч. закл. / В. О. Тіманюк, О. М. Животова. – Х.: вид – во НФаУ; Золоті сторінки, 2003. – С. 187 – 193.

БІОЕЛЕКТРИЧНІ ПОТЕНЦІАЛИ

Деякі процеси життєдіяльності організму супроводжуються появою в його тканинах і клітинах електрорушійних сил, і тому біоелектричні потенціали можуть служити тонким і чутливим показником, який характеризує нормальні фізіолого-біохімічні процеси, а також патологічні явища, що відбуваються в протоплазмі клітин.

Величини біопотенціалів зазвичай не перевищують 50 – 150 мВ.

Різноманітні біопотенціали можна умовно розділити на наступні групи:

1. Потенціали спокою. Різниця потенціалу реєструється між зовнішньою поверхнею і внутрішнім вмістом неушкоджених клітин.

2. Потенціали ушкодження, або демаркаційні. Різниця потенціалів реєструється між ушкодженими і неушкодженими ділянками тканини, органа, клітини.

3. Потенціали дії, або збудження. Виникають між збудженими і незбудженими ділянками при дії подразників.

4. Стаціонарні. Виникають між ділянками з різною швидкістю (і напрямом) метаболічних процесів: між зовнішньою і внутрішньою поверхнею шкіри, між коренем і стеблом, між стеблом і листом, між освітленою і затіненою частинами одного і того ж листа і т. п. Ці потенціали іноді називають ще метаболічними, але це не зовсім правильно, тому що з метаболізмом, в принципі, зв'язане і виникнення перших трьох груп потенціалів.

Усі потенціали, за винятком окисно-відновних, є результатом асиметричного розподілу іонів. Природа цієї асиметрії різна для всіх потенціалів.

Лабораторна робота № 10

ВИЗНАЧЕННЯ ПОТЕНЦІАЛІВ РІЗНОГО ПОХОДЖЕННЯ

Завдання 1. Вивчення динаміки потенціалу фотосинтезу на листі примули

Мета: засвоїти методику визначення динаміки фотосинтезу на рослинних об'єктах.

Основні завдання:

1. Визначити динаміку потенціалу фотосинтезу на листі примули.
2. Визначити динаміку потенціалу фотосинтезу, використовуючи суспензію хлоропластів з листів примули.

Обладнання, апаратура, матеріали і реактиви:

1. Прилади: прилад для реєстрації потенціалу фотосинтезу із гальванометром у своєму складі, лампа потужністю 150 – 200 Вт.

2. Посуд, допоміжні знаряддя: звичайні пробірки, піпетки, хімічні склянки, штативи для пробірок.
3. Реактиви: фосфатний буфер (Na_2HPO_4 , 1/15 M).
4. Матеріали: примула, листя примули.

Питання для підготовки та обговорення:

1. Як класифікуються біопотенціали?
2. Яка основна причина виникнення біопотенціалів?
3. Що таке дифузійний, мембранний, фазовий потенціал?
4. Що характеризує величина біопотенціала?

Хід роботи.

1. Зібрати вимірювальну схему (рис. 8):

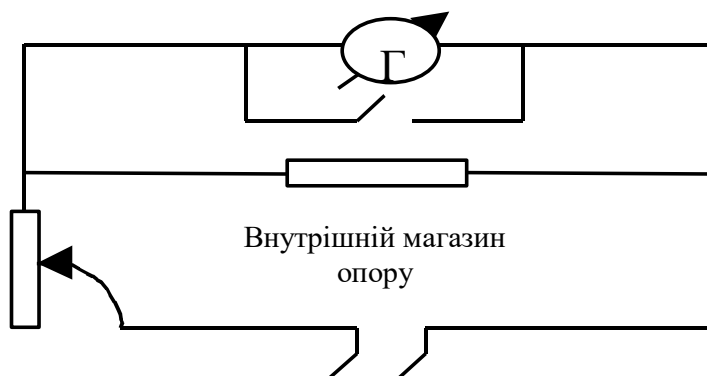


Рис. 8. Вимірювальна схема для реєстрації потенціалу фотосинтезу.

2. Поруч із кущем примули, який росте у горщику, помістити обклеєну чорним папером коробку. Верхівку листа примули ввести у коробку через проріз у її стінці, прикрити щілину смужками чорного паперу.

Один голчастий електрод вколоти у ту частину листа, що залишилася зовні коробки, а другий – у частину, що знаходиться в коробці, замкнути ключ і відзначити показання “зайчика” на матовій шкалі дзеркального гальванометра.

Після цього рослину освітлити лампою потужністю 150-200 Вт. Щоб уникнути перегріву рослини можна помістити між лампою і листом водяний фільтр. Освітлення здійснити протягом 15-60 хв., після чого виключити лампу і відкрити коробку.

Спостерігати зміну різниці потенціалів під час висвітлення і протягом години після припинення освітлення. Показання гальванометра записують кожні 5 хв.

На підставі отриманих даних побудувати графік, що відбиває зміни величини потенціалу під час фотосинтезу.

2. У U-образну трубку помістити суспензію хлоропластів. Для приготування суспензії листи примули розтерти у ступці. Додати фосфатний буфер (Na_2HPO_4 , 1/15 M) і віджати отриману суспензію через полотнину. Освітлити половину трубки, затемнюючи в той же час іншу половину. Потенціал відводити за допомогою каломельних чи платинових електродів

на гальванометр. Схема проведення роботи й оформлення результатів вимірів ті ж, що й у попередньому завданні.

Висновки: ...

Завдання 2. Визначення потенціалу ушкодження рослинних тканин.

Мета: засвоїти методику визначення потенціалу ушкодження рослинних тканин.

Основні завдання:

1. Визначити напрямки і величини відхилення електричного струму, які виникають при пошкодженні листа примули.

Обладнання, апаратура, матеріали і реактиви:

1. Прилади: прилад для реєстрації потенціалу фотосинтезу із гальванометром у своєму складі.

2. Матеріали: примула, листя примули.

Питання для підготовки та обговорення:

1. Надати характеристику потенціалів ушкодження.

Хід роботи.

1. Зібрати схему, наведену у завданні 1.

2. Один голчастий електрод вколоти у черешок листа примули (алое, лілії). Через 2-3 хв. після введення електрода нанесена при цьому альтерація практично зникає. Після цього в черешок листа вколоти другий електрод вище першого і швидко замкнути ключ. Записати показання гальванометра – величину і напрямок відхилення. Відстежити зміни величини потенціалу в часі. Гальванометр при цьому залишається включеним. Через 1-2 хв. (коли потенціал значно знизиться) закоротити гальванометр, перший електрод вийняти і вколоти у черешок листа вище другого електрода. Визначити напрямок і величину відхилення електричного струму.

3. Результати вимірів представити у вигляді графіків (на осі абсцис відкласти час, а по осі ординат – величину потенціалу).

Висновки: ...

Завдання 3. Реєстрація потенціалу спокою нерва і м'яза жаби.

Мета: засвоїти методику визначення потенціалу спокою нерва та м'яза жаби.

Основні завдання:

Визначити величини відхилення електричного струму, які виникають при реєстрації потенціалів спокою в органах жаби, після різних видів альтерації.

Обладнання, апаратура, матеріали і реактиви:

1. Прилади: прилад для реєстрації потенціалу спокою із гальванометром у своєму складі.

2. Матеріали: жаба.

Питання для підготовки та обговорення:

1. Яка природа потенціалів спокою та дії?

Хід роботи.

1. Спочатку необхідно виготовити препарат задніх кінцівок жаби й відпрепарувати сідничний нерв до колінного суглоба. Потім захопити пінцетом ахіллезове сухожилля, підрізати його й відпрепарувати литковий м'яз до коліна.

2. Нервово-м'язовий препарат розташувати у камері і знайти найменш ушкоджену ділянку нерва, на яку помістити електроди, що неполяризуються.

3. Відзначити на шкалі гальванометра місце розташування "зайчика". Потім на ділянку нерва, що розташована на одному з електродів, нанести термічну альтерацію. Для цього зазначену ділянку нерва припекти розпеченим зондом. При нанесенні альтерації треба стежити за тим, щоб нерв не був зрушений з електродів.

Записати величину відхилення "зайчика" від первісного положення і відстежити її зміни в часі.

4. Те ж саме зробити з литковим м'язом, але альтерацію нанести механічним шляхом (глибокий розріз м'яза).

Висновки: ...

Питання для контролю:

1. Надати загальну характеристику потенціалів.

2. Надати загальну характеристику фотосинтезу, його фаз, закономірності транспорту електронів.

3. Охарактеризувати потенціал фотосинтезу.

4. Охарактеризувати потенціал пошкодження.

5. Охарактеризувати фазові потенціали.

6. Охарактеризувати статистичний характер фазових потенціалів.

7. Охарактеризувати метаболічні потенціали. Охарактеризувати механізми їх виникнення і роль у функціонуванні клітин.

8. Охарактеризувати альтераційні потенціали, їх походження і біологічне значення.

Література до розділу:

1. Медична і біологічна фізика: Навчальний посібник для студентів спеціальності 222 «Медицина» / Е.І. Сливко, О.З. Мельнікова, О.З. Іванченко, Н.С. Біляк. – Запоріжжя, 2018. – С. 102 – 117.

2. Методичні вказівки для самостійної роботи студентів, лабораторні роботи та завдання із курсу біофізики (Для студентів біологічного факультету усіх форм навчання) / О.В. Запорожченко, Л.М Карпов, С.А. Петров, О.К. Будняк, Н.Л. Федорко. – Одеса, 2003. – С. 29 – 31.

ЕЛЕКТРОКІНЕТИЧНІ ЯВИЩА

Ефекти зміщення фаз гетерогенної системи під впливом накладеного електричного поля, а також виникнення різниці потенціалів у гетерогенній системі, що піддавалась механічному змішанню, носять загальну назву електрокінетичних явищ.

До електрокінетичних явищ відносяться: електрофорез – рух дисперсної фази по відношенню до дисперсійного середовища в електричному полі; електроосмос – рух дисперсійного середовища щодо дисперсної фази (наприклад, пористої перегородки), що відбувається під впливом електричного струму; потенціали плинності (протікання) – потенціали, що виникають у результаті руху рідини через пори пористої перегородки під впливом різниці гідростатичного тиску; потенціали осідання (седиментації), тобто потенціали, що виникають у гетерогенній системі під впливом сили тяжіння між верхніми і нижніми шарами системи.

Усі ці явища так чи інакше пов'язані з виникненням стрибка потенціалу на межі між дисперсною фазою і дисперсійним середовищем. Такий потенціал називається електрокінетичним.

У залежності від заряду часток розрізняють катодфорез – рух до катоду й анофорез – рух до аноду. Про величину електрокінетичного потенціалу судять побічно, вимірюючи швидкість руху часток, що утворюють дисперсну фазу, або вимірюючи швидкість руху дисперсійного середовища в електричному полі.

Величина ζ -потенціалу відносно постійна для поверхні даного виду клітини тих чи інших її органів. Ця величина може піддаватися змінам за умов дії на клітину різних ушкоджуючих факторів, поверхнево-активних речовин, іонів, антибіотиків і т. п. Тому метод електрофорезу використовується для вивчення властивостей поверхні живих структур і для оцінки функціонального або патологічного стану клітин або одноклітинних організмів.

Лабораторна робота № 11

ВИЗНАЧЕННЯ ξ -ПОТЕНЦІАЛУ ДРІЖДЖОВИХ КЛІТИН

Мета: засвоїти методику визначення ξ -потенціалу та електрофоретичної рухливості дріжджових клітин.

Основні завдання:

1. Визначити швидкість руху дріжджових клітин у електричному полі.
2. Навчитися розраховувати електрофоретичну рухливість та ξ -потенціал дріжджових клітин за швидкістю їх руху у електричному полі.

Обладнання, апаратура, матеріали і реактиви:

1. Прилади: установка для мікроелектрофорезу.

2. Посуд, допоміжні знаряддя: звичайні пробірки, піпетки, хімічні склянки, штативи для пробірок.

3. Реактиви: 8 %-ний забуферений цитратним буфером за Мак-Ільвеном розчин сахарози, рН 8,0.

4. Матеріали: звичайні пресовані дріжджі.

Питання для підготовки та обговорення:

1. Що таке електрокінетичні явища?

2. Що таке електрофорез, електроосмос? Наведіть їх приклади у біологічних системах.

3. Як розрахувати величину ξ -потенціалу?

Хід роботи.

1. Невеликий шматочок палички звичайних пресованих дріжджів помістити у колбу з 8 %-ним забуференим розчином сахарози і ретельно розмішати скляною паличкою. Для забуферування застосувати фосфорно-цитратний буфер за Мак-Ільвеном (19,45 мл 0,2 М Na_2HPO_4 і 0,55 мл 0,1 М лимонної кислоти). Розчин приготувати із розрахунку 9 об'ємів 8 %-ного розчину сахарози і 1 об'єм буферного розчину рН 8,0. Якщо суспензія дріжджів сильно густа, її розбавити у кілька разів тим же розчином.

2. Зібрати установку для мікроелектрофорезу за наступною схемою (рисунок 9):

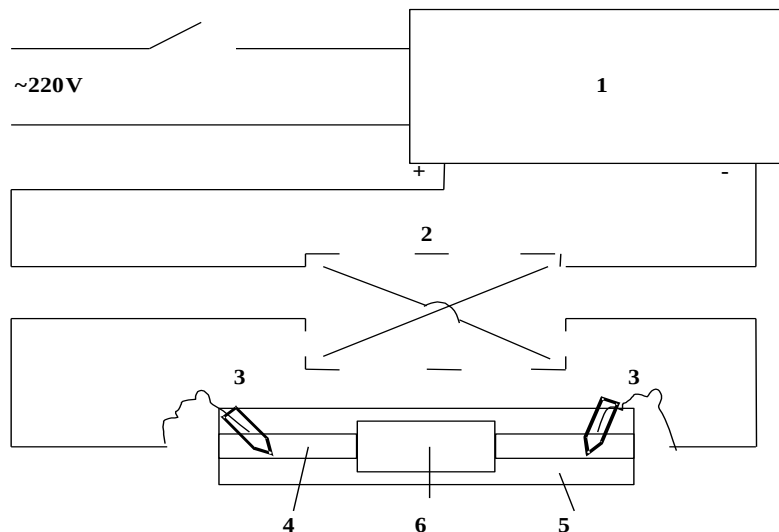


Рис. 9. Схема установки для мікроелектрофорезу.

Як джерело струму використовувати блок-випрямник електрофорезу (1) (рис. 9). Струм через 6-клемний ключ (2) подавати на неполяризуючі електроди (3), потім через смужки фільтрувального паперу (4), змочені електролітом, на електрофоретичну камеру, що являє собою камеру Горяєва (5) з покритим скельцем (6). Камеру помістити на предметний столик мікроскопа.

3. Для виготовлення неполяризуючого електроду використовувати скляну трубку із внутрішнім діаметром 4-5 мм, один кінець якої закрити пробкою, зробленою з каоліну, замішаному на рингерівському розчині. Цій каоліновій пробці додати вид черевичка з більш-менш витягнутим кінчиком. Черевичок парафінувати, а потім його кінчик зрізати під кутом, зручним для розміщення на вологому контакті. У скляну трубочку налити насичений розчин сірчаноокислої міді і вставити провідник з мідною пластинкою. (У роботі можливо використовувати неполяризуючі електроди іншої природи, наприклад, платинові.)

4. На камеру Горяєва нанести суспензію дріжджів, накрити покривним скельцем, змочити вологі контакти електролітом (цитратний буфер), встановити напругу 80 – 100 В за допомогою реостату, замкнути 6-клемний ключ, спостерігати через окуляр мікроскопа за напрямком руху дріжджових клітин (до "+" або до "-") і визначити за який час (сек) клітини пройдуть шлях, рівний стороні квадрата в камері. Потім змінити положення 6-клемного ключа і провести аналогічні виміри. Зробити 10 вимірів і обчислити середнє арифметичне.

5. Швидкість руху частки в електричному полі визначити за формулою:

$$\omega = S / T \quad (1)$$

де S – шлях, пройдений часткою (у см) за час t (сек), ω – швидкість (см · сек⁻¹).

6. Виходячи із знайденої величини швидкості (ω), обчислити рухливість (електрофоретичну швидкість ϖ), тобто відношення лінійної швидкості до градієнта потенціалу електричного поля, тобто:

$$\varpi = \omega / E = S / (T \cdot E) \quad (2)$$

$$E = V / l \quad (3)$$

де E – напруженість поля, В · см⁻¹;

V – напруга, що подається в камеру, В;

l – відстань між електродами, см.

7. Знаючи градієнт потенціалу (напруженість поля E) і визначивши швидкість руху частки ω , можна обчислити величину ξ -потенціалу:

$$\xi = \frac{4\pi\eta\omega}{D \cdot E} = \frac{4\pi\eta\omega l}{D \cdot V} \quad (4)$$

де η – в'язкість середовища, яка дорівнює для води при + 20° С – 0,01 · 10⁻² г · см⁻¹ · сек⁻¹; l – довжина камери (відстань між електродами) у см.

У формулі (3) розмірність V і відповідно ξ – потенціалу становить (в одиницях СГСЕ) г^{1/2} · см^{1/2} · сек⁻¹.

Знаючи, що $1\text{В} = 1/300$ абсолютної електростатичної одиниці потенціалу, виразити потенціал у вольтах. Для цього необхідно помножити праву частину рівняння (4) на 300. У підсумку одержуємо:

$$\xi = \frac{4\pi\eta\omega l \cdot 300}{D \cdot V} \quad (5)$$

Оскільки напругу вимірюють у вольтах, необхідно розділити знаменник правої частини рівності (5) на 300, тобто

$$\xi = \frac{4\pi\eta\omega l \cdot 300}{D \cdot \frac{V}{300}} \quad (6)$$

Підставляючи замість η і D їхні чисельні значення для води 0,01 і 81, та вважаючи π рівним 3,14, маємо

$$\xi = \frac{4 \cdot 3,14 \cdot 0,01 \cdot 90000\omega l}{81 \cdot V} \quad (7)$$

Приймаючи $\omega = S / t$ і $V / l = E$, маємо

$$\xi = 140 \cdot \omega \cdot l / V = S / (t \cdot E), \text{ або } 140 \cdot \varpi \quad (8)$$

Приклад: напруга в ланцюзі – 100 В. Відстань між кінцями агарових сифонів складає 2 см. Шлях, пройдений дріжджовими клітинами – 0,02 см. Час проходження цієї відстані 5 секунд.

Спочатку обчислимо величину рухливості (електрофоретичної швидкості) дріжджової клітини, підставляючи у формулу чисельні значення S , V , l і t :

$$\varpi = \frac{0,02\text{см} \cdot 2\text{см}}{5\text{сек} \cdot 100\text{В}} = 8,0 \cdot 10^{-5} (\text{см}^2 / \text{В} / \text{сек});$$

Визначаємо ξ –потенціал:

$$\xi = 140 \cdot 8,0 \cdot 10^{-5} = 11,2 (\text{мВ}).$$

Висновки: ...

Питання для контролю:

1. Охарактеризувати поняття електрокінетичні явища.
2. Надати характеристику явищам електрофореzu та електроосмосу, потенціалам осідання та протікання. Навести приклади цих явищ.
3. Надати характеристику подвійному електричному шару.

4. Надати характеристику електротермодинамічному потенціалу.
5. Надати характеристику електрокінетичному (ζ) потенціалу та пояснити його роль для функціонування клітин та тканин.

Література до розділу:

1. Зима В.Л. Біофізика. Практикум: Навчальний посібник / В.Л. Зима, М.С. Мірошніченко, Т.Л. Давидовська, В.П. Ганчурін, Ю.І. Прилуцький. – К.: Видавничо-поліграфічний центр "Київський університет", 2003. – С. 83 – 89.
2. Практикум з біофізики : навч. посіб. : [для студ. вищ. навч. закл.] / А.В. Тарновська, М.Б. Галан, Н.П. Головчак, М.В. Бура, Д.І. Санагурський. – Львів : ЛНУ імені Івана Франка, 2011. – С. 41 – 46.

ВИВЧЕННЯ ЕЛЕКТРОПРОВІДНОСТІ БІОЛОГІЧНИХ ОБ'ЄКТІВ

Прийнято розрізняти два механізми проведення електричного струму через речовину: електронну провідність і іонну, або електролітичну. Електронний механізм провідності має місце в металах, електролітичний – у рідинах. Основним механізмом, що обумовлює проведення електричного струму в живих системах, є електролітичне проведення. Проходженню постійного електричного струму живий об'єкт створює певний активний опір R . Великий опір створюється при проходженні низькочастотного перемінного струму, а зі збільшенням частоти струму він зменшується. Крім того, при проходженні як постійного, так і перемінного струму в біологічних об'єктах спостерігається явище електричної поляризації. На поверхні мембрани рівномірно заряджені іони так перерозподіляються, що утворюється електричне поле, спрямоване протилежно прикладеному ззовні електричному полю. Явище поляризації властиво тільки живим, інтактним, клітинам і тканинам. Факти, а саме зменшення опору зі збільшенням частоти і поляризаційні ефекти, дозволяють припустити, що мембрана живих клітин у певному наближенні представляється у вигляді зарядженої ємності. Поляризаційна ємність при проходженні постійного струму може досягати для клітин від 1 мкф до 10 мкф на см².

Таким чином, проходження перемінного струму залежить від двох складових – активного опору R і реактивного, ємнісного опору R_c . У живих тканинах немає індуктивного опору, воно характерно тільки для металевих матеріалів. Ємнісний опір записується у виді:

$$R_c = \frac{1}{\omega C},$$

де ω – частота перемінного струму; C – ємність. Наявність ємнісної складової в живих системах призводить до того, що опір тканин клітин залежить від частоти перемінного струму. Зі збільшенням частоти, коли $\omega \rightarrow \infty$, величина ємнісного опору наближається до нуля і завдяки цьому сумарний опір на високих частотах наближається до величини активного опору. При проходженні перемінного електричного струму через тканину визначається сумарний опір, названий *імпедансом* (Z), що складається з активної і ємнісної складових. Для різних комбінацій опору R і ємності C можливі різні вираження імпедансу. У випадку послідовного з'єднання активного опору R і ємності C імпеданс дорівнює:

$$Z = \sqrt{R^2 + \frac{1}{\omega^2 C^2}}$$

У випадку паралельного з'єднання R і C :

$$Z = \frac{1}{\sqrt{\frac{1}{R^2} + \omega^2 C^2}}$$

Часто вимірюють електропровідність тканин (Y) – величину, зворотну сумарному опору,

$$Y = \frac{1}{Z}$$

Одиниця електропровідності – сименс, 1 сименс дорівнює Ом^{-1} .

Метод електропровідності використовується в біології для характеристики властивостей живого і вивчення змін, пов'язаних з функціональним поведінням і порушеннями фізіологічних процесів. Експериментально було показано, що опір тканин зменшується зі збільшенням частоти, і при частотах вище $10^6 - 10^8$ Гц опір наближається до постійного рівня. Крива залежності опору від частоти називається *дисперсією опору живих систем*. Дисперсія опору є дуже важливою характеристикою живих систем. При функціональних змінах в об'єкті, зокрема при патологічних станах, вигляд кривої дисперсії опору змінюється. Цей критерій може служити тестом для визначення життєздатності тканини. Тарусов Б.Н. (1978) запропонував більш просту оцінку дисперсії опору. Визначається коефіцієнт поляризації:

$$K = \frac{R_{10^4}}{R_{10^6}},$$

де R_{10^4} – опір при частоті 10^4 Гц; R_{10^6} – опір при частоті 10^6 Гц. У неушкоджених тканинах K більше одиниці. В органах з інтенсивним обміном речовин його значення досягає 9 – 10 одиниць (печінка ссавців). Якщо обмін слабкіше (печінка жаби), то $K = 2 - 3$. У мертвій тканині поляризаційний коефіцієнт K наближається або дорівнює 1.

Експериментально опір (чи електропровідність) біологічних об'єктів визначають за допомогою мостів перемінного струму.

Лабораторна робота № 12

ВИМІР ОПОРУ БІОЛОГІЧНИХ ОБ'ЄКТІВ КОМПЕНСАЦІЙНИМ МЕТОДОМ

Мета: засвоїти методику визначення опору різних біологічних об'єктів.

Основні завдання:

Визначити опір різних біологічних об'єктів.

Обладнання, апаратура, матеріали і реактиви:

1. Прилади: реохордний міст.
2. Матеріали: біоб'єкти різного походження.

Питання для підготовки та обговорення:

1. Що таке реактивний і ємнісний опір?
2. Що таке імпеданс?

Хід роботи.

1. Опір різних біологічних об'єктів вимірюють за допомогою мостової схеми (рисунк 10):

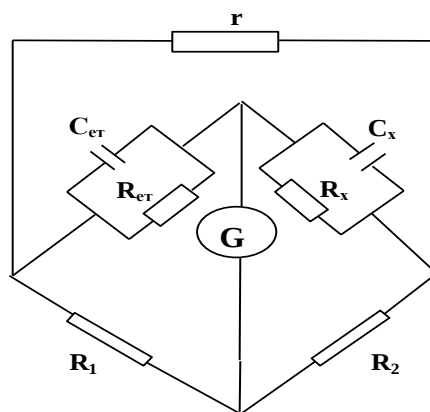


Рис. 10. Мостова схема для виміру опору біоб'єктів.

До одного з пліч моста (рис. 10) підключити магазини опорів ($R_{ет}$) і магазини ємностей ($C_{ет}$). До другого плеча приєднати електроди, які введені у об'єкт, що досліджується.

Виміряти подовжній і поперечний опір різних біологічних об'єктів (шкіра, м'язи, печінка жаби; алое, лілія й ін.).

2. Потім цей об'єкт помістити у киплячу водяну баню на 1-2 хв., визначити опір і дані занести у таблицю 13:

Таблиця 13.

№	Об'єкт	Загальний опір, Ом	Ємнісний опір, Ом	Омічний опір, Ом	Висновок
1.					
...					
10					

Висновки: ...

Питання для контролю:

1. Охарактеризувати мембранні потенціали, їх виникнення і біологічне значення.
2. Охарактеризувати потенціали спокою і механізми їх виникнення.
3. Охарактеризувати потенціали дії у збуджених клітин.
4. Охарактеризувати процеси розповсюдження потенціалів дії.
5. Охарактеризувати дифузні потенціали і механізми їх виникнення.
6. Розкрити суть електричної моделі імпедансу клітин і тканин живого організму.
7. Охарактеризувати вплив факторів середовища і патологічних станів на величину електропровідності клітин і тканин.

Література до розділу:

1. Ємчик Л.Ф. Медична біофізика. Інтегрований курс лекцій. Навч. посібник / Л.Ф. Ємчик, Я.М. Кміт ; за ред. проф. У. С. Гончаренка. – Львів: Місіонер, 1988. – С. 60 – 70.
2. Медична і біологічна фізика: Навчальний посібник для студентів спеціальності 222 «Медицина» / Е.І. Сливко, О.З. Мельнікова, О.З. Іванченко, Н.С. Біляк. – Запоріжжя, 2018. – С. 146 – 154.
3. Медична та біологічна фізика : підручник для студ. вищих мед. (фарм.) навч. заклад. / [О. В. Чалий, Я. В. Цехмістер, Б. Т. Агапов та ін.] ; за ред. проф. О. В. Чалого. — Вид. 2-ге. — Вінниця : Нова Книга, 2017. — С. 284 – 300.
4. Методичні вказівки для самостійної роботи студентів, лабораторні роботи та завдання із курсу біофізики (Для студентів біологічного факультету усіх форм навчання) / Укладачі: О.В. Запорожченко, Л.М. Карпов, С.А. Петров, О.К. Будняк, Н.Л. Федорко. – Одеса, 2003. – С. 36 – 38.

БІОФІЗИКА СКЛАДНИХ БІОЛОГІЧНИХ СИСТЕМ. МАТЕМАТИЧНЕ МОДЕЛЮВАННЯ СКЛАДНИХ БІОЛОГІЧНИХ СИСТЕМ

Біофізика складних систем спирається на концепцію цілісності, вивчає різноманітні макроскопічні системи, які складаються з безлічі елементів різного рівня організації, кооперативна поведінка яких зумовлює виникнення нових структур, формування складних функцій та поведінки у змінному середовищі. Тобто в основу таких досліджень покладено системний підхід.

Одним з інструментів дослідження складних систем є математичне моделювання, під яким розуміють метод дослідження властивостей матеріалів та явищ через побудову їх математичних моделей. При цьому опис поведінки досліджуваного матеріалу або явища виражається за допомогою математичної символіки.

При вивченні складних систем об'єкт, який досліджується, замінюється іншим, більш простим, який зберігає істотні для даного дослідження властивості. Такий простий об'єкт дослідження називають моделлю. Моделювання – це метод, при якому дослідження складного об'єкта (процеса, явища), замінюється дослідженням його моделі.

Моделювання – один з основних методів біофізики. Його використовують на всіх рівнях вивчення живих систем, починаючи від молекулярної біофізики, біофізики мембран, біофізики клітини та органів і закінчуючи біофізикою складних систем.

Основними етапами моделювання є: первинний збір інформації; постановка завдання; обґрунтування основних допущень; створення моделі, її дослідження; перевірка адекватності моделі реальному об'єкту. Таким чином, модель узгоджує реальний об'єкт для дослідження.

Результат моделювання поглиблює знання про об'єкт дослідження, проте, як за правило, не дає вичерпних даних про нього, що викликає створення уточнюючих, або, взагалі, принципово нових моделей дослідження.

У математичному моделюванні часто використовують диференціальні рівняння, наприклад, коли процеси, що вивчаються, або явища зручно описувати плоскими функціями, коли в описі беруть участь такі поняття, як швидкість, пришвидшення. Тут мають на увазі не швидкість якої-небудь точки або тіла, а швидкість перебігу процесу: це можуть бути процеси наповнення, поширення тощо.

У біофізиці, біології і медицині часто застосовують фізичні, біологічні, математичні моделі. Поширеним є також аналогове моделювання.

Лабораторна робота № 13

МОДЕЛЮВАННЯ ПРИРОДНОГО ЗРОСТАННЯ ЧИСЕЛЬНОСТІ ПОПУЛЯЦІЇ (ЗА МОДЕЛЯМИ МАЛЬТУСА ТА ВОЛЬТЕРРА)

Завдання 1. Модель природного зростання чисельності популяції (модель Мальтуса).

Мета: Навчитися складати і вирішувати (аналітично і за допомогою ПК) кінетичні рівняння при моделюванні процесів зміни чисельності популяції, використовуючи модель Мальтуса. Проводити аналіз отриманих рішень, графічно представляти результати.

Основні завдання:

1. Знайти закони зміни чисельності популяції в часі згідно моделі Мальтуса.
2. Проаналізувати поведінку змодельованої системи при різних її параметрах.

Обладнання, апаратура, матеріали і реактиви:

1. Прилади: комп'ютер, програма для математичних розрахунків.

Питання для підготовки та обговорення:

1. Надати характеристику процесів зміни чисельності популяції згідно моделі Мальтуса.
2. Охарактеризувати основні правила, пов'язані з рішенням диференціальних рівнянь.

Хід роботи.

Дана реальна система: є деяка популяція одного вигляду (мікроорганізми, зайці тощо), у якій відбуваються життєві процеси у всьому їх різноманітті.

1. *Знайти закони зміни чисельності популяції в часі.*

Основні припущення:

- 1) існують тільки процеси розмноження і природної загибелі, швидкості яких пропорційні чисельності особин у певний момент часу;
- 2) не враховуються біохімічні, фізіологічні процеси;
- 3) не відбувається боротьба між особинами за житло, за їжу (нескінченно великий простір та кількість їжі);
- 4) розглядається тільки одна популяція, немає хижаків.

Модель. Величини: x – чисельність популяції у момент часу t ; R – швидкість розмноження; γ – коефіцієнт розмноження; S – швидкість природної загибелі; σ – коефіцієнт природної загибелі; dx/dt – швидкість зміни чисельності популяції; ε – коефіцієнт зростання.

Тоді $R = \gamma \cdot x$, $S = -\sigma \cdot x$.

Зміна чисельності особин за одиницю часу визначається кількістю народжених за цей час особин та особин померлих:

$$(dx / dt) = \varepsilon \cdot x.$$

Початкова умова: якщо $t = 0$, чисельність особин $x = x_0$:

$$x = x_0 \cdot e^{\varepsilon t}$$

Аналіз розв'язання:

а) $\varepsilon < 0$ (якщо $\sigma > \gamma$), тобто швидкість загибелі більша за швидкість розмноження. Чисельність особин з плином часу зменшиться до нуля;

б) $\varepsilon > 0$ (якщо $\gamma > \sigma$), тобто швидкість розмноження більша за швидкість загибелі. Чисельність особин необмежено збільшується з часом;

в) $\varepsilon = 0$ (якщо $\sigma = \gamma$), тобто швидкість загибелі дорівнює швидкості розмноження. Чисельність особин не змінюється, залишаючись на початковому рівні.

Модель, якщо $\varepsilon > 0$, адекватна реальності лише до певних значень часу. Згідно з цією моделлю, за якою розглядається зменшення чисельності особин тільки за рахунок природної загибелі, їх чисельність має нескінченно збільшуватися з плином часу, що не відповідає реальності.

2. Проаналізувати поведінку системи при різних параметрах γ , σ , x_0 .

Для цього: 1. Записати закон зміни $x(t)$ для заданих параметрів.

2. Обчислити $x(t)$ на комп'ютері.

3. Побудувати графіки $x(t)$. Криві $x(t)$ для різних γ повинні бути представлені всі на одному рисунку, відповідно для різних σ – на іншому, для різних x_0 – на третьому.

4. Оцінити з графіків характерні значення процесу:

а) Час $T_{0,5}$, коли кількість особин зміниться в 2 рази в порівнянні з початковою. Порівняйте з розрахованими величинами:

$$T_{0,5} = \frac{\ln 2}{|\varepsilon|}.$$

Побудувати графік залежності $T_{0,5}(|\varepsilon|)$.

Зробити висновок про вплив коефіцієнта зростання на характерний час $T_{0,5}$.

б) Швидкість зміни чисельності популяції при $t = 0$. Зіставити з розрахованими величинами:

$$dx / dt = x_0 \varepsilon, \text{ при } t = 0$$

Зробити висновок про вплив ε на швидкість зміни чисельності популяції в початковий момент часу.

Завдання 1. Проаналізувати поведінку системи при зміні коефіцієнта зростання $\varepsilon > 0$ ($\gamma > \sigma$). Заповнити таблицю 14:

Таблиця 14.

Параметри	γ , 1/годину	σ , 1/годину	ε , 1/годину	x_0	Закон змін $x(t)$
1 система					
2 система					
3 система					

Завдання 2. Проаналізувати поведінку системи при зміні коефіцієнта зростання $\varepsilon < 0$ ($\gamma < \sigma$). Заповнити таблицю 15:

Таблиця 15.

Параметри	γ	σ	ε	x_0	Закон змін $x(t)$
1 система	0,5	0,6	-0,1	50	
2 система	0,4	0,6	-0,2	50	
3 система	0	0,6	-0,6	50	

Завдання 3. Проаналізувати поведінку системи при зміні коефіцієнта зростання $\varepsilon = 0$ ($\gamma = \sigma$). Заповнити таблицю 16:

Таблиця 16.

Параметри	γ	σ	ε	x_0	Закон змін $x(t)$
Система	0,6	0,6	0	50	

Завдання 4. Проаналізувати поведінку системи при змінах початкової чисельності особин x_0 . Заповнити таблицю 17:

Таблиця 17.

Параметри	γ	σ	ε	x_0	Закон змін $x(t)$
1 система	0,8	0,6	0,2	10	
2 система	0,8	0,6	0,2	50	
3 система	0,8	0,6	0,2	100	

Висновок: ...

Завдання 2. Модель «хижак-жертва» (модель Вольтерра)

Мета: Навчитися складати і вирішувати (аналітично і за допомогою ПК) кінетичні рівняння при моделюванні процесів зміни чисельності популяції використовуючи модель Вольтерра. Проводити аналіз отриманих рішень, графічно представляти результати.

Основні завдання:

1. Знайти закони зміни чисельності популяції в часі згідно моделі Вольтерра.
2. Проаналізувати поведінку змодельованої системи при різних її параметрах.

Обладнання, апаратура, матеріали і реактиви:

1. Прилади: комп'ютер, програма для математичних розрахунків.

Питання для підготовки та обговорення:

1. Надати характеристику процесів зміни чисельності популяції згідно моделі Вольтерра.
2. Як модель «хижак–жертва» використовують у медицині?

Хід роботи.

Серед припущень, введених у попередній роботі, анулювати допущення 4. Нехай в певному просторі живуть два види особин: зайці (жертви) і рисі (хижаки). Зайці харчуються рослинною їжею, наявної завжди в достатній кількості (між ними відсутня внутрішньовидова боротьба). Рисі можуть харчуватися тільки зайцями.

Введемо величини: x – кількість жертв у момент часу t ; y – кількість хижаків у момент часу t .

Рівняння балансу між чисельністю народжених і загинув особин:

– жертви: $dx/dt = \varepsilon x - \alpha xy$ (швидкість розмноження) – σx (швидкість природної загибелі) – αxy (швидкість загибелі через зустріч з хижаком);

– хижаки: $dy/dt = \delta xy - \beta y$ (швидкість розмноження) – βy (швидкість природної загибелі);

$$\begin{cases} \frac{dx}{dt} = \varepsilon x - \alpha xy; \\ \frac{dy}{dt} = \delta xy - \beta y. \end{cases}$$

$$x_{\text{ст}} = \frac{\beta}{\delta}, Y_{\text{ст}} = \frac{\varepsilon}{\alpha}$$

У результаті розв'язання, чисельність особин за малих відхилень від стаціонарних значень становить:

$$x(t) = x_{\text{ст}} + U_{\text{max}} \sin \sqrt{\varepsilon \beta} t,$$

$$y(t) = Y_{\text{ст}} + V_{\text{max}} \sin(\sqrt{\varepsilon \beta} t + \varphi_0).$$

Таким чином, чисельність популяцій x і y зазнають гармонічних коливань відносно стаціонарних значень з однаковою чисельністю, але зсунуті за фазою на φ_0 . Синусоїдне розв'язання можливе лише за малих відхилень U і V від стаціонарних значень. У разі великих відхилень закон не буде гармонізованим. Проте така модель цілком адекватна дійсності: зі збільшенням чисельності хижаків відбувається зменшення їх жертв і навпаки з однаковою частотою ці явища спостерігається зі зсувом за фазою.

Модель «хижак–жертва» використовують у медицині. Так, під час моделювання онкологічних захворювань пухлинні клітини розглядають як жертви, а лімфоцити, які можуть їх пригнічувати, – як хижаки. У цьому випадку моделювання дозволяє здобути нові знання про процеси міжклітинної взаємодії у разі патології, знаходити оптимальну стратегію лікування, створювати нові засоби боротьби з ними.

Виконання завдань роботи.

Проаналізувати поведінку системи при різних параметрах α , β , ε , δ , а також при різних початкових умовах x_0 і y_0 .

Для цього:

1. Для кожної сукупності параметрів за допомогою ПК побудувати серію графіків залежностей $x(t)$ і $y(t)$ (на одному малюнку) і відповідні їм фазові портрети системи.

2. Оцінити період коливань численності хижаків і жертв за графіками.

3. Провести дослідження за допомогою ПК, при яких співвідношеннях параметрів модель «хижак-жертва» практично перетворюється в модель природного зростання (модель Мальтуса).

Варіанти зміни параметрів наведені в таблиці 18:

Таблиця 18.

Параметри	ε , 1/рік	β , 1/рік	α	δ	$x_{\text{ст}}$	$y_{\text{ст}}$	Початкові умови	
							$x_0 = x_{\text{ст}} + \Delta x$	$y_0 = y_{\text{ст}} + \Delta y$
1 система	0,5	0,72	0,125	0,009			$x_0 = x_{\text{ст}} + 0,05x_{\text{ст}}$	$y = y_{\text{ст}}$
2 система	0,5	0,72	0,125	0,009			$x_0 = x_{\text{ст}} + 0,1x_{\text{ст}}$	$y = y_{\text{ст}}$
3 система	0,5	0,72	0,125	0,009			$x_0 = x_{\text{ст}} + 0,5x_{\text{ст}}$	$y = y_{\text{ст}}$
4 система	0,5	0,72	0,125	0,009			$x_0 = x_{\text{ст}} + x_{\text{ст}}$	$y = y_{\text{ст}}$

Висновки:...

Питання для контролю:

1. Що таке модель? Які типи моделей використовуються в біології та медицині?
2. Що таке математична модель?
3. Які основні етапи моделювання?

Література до розділу:

1. Біофізика і біомеханіка : підруч. / В. С. Антонюк, М. О. Бондаренко, В. А. Ващенко та ін. – К.: НТУУ "КП", 2012. – С. 176 – 183.
2. Тіманюк В. О. Біофізика: Підруч. для студ. вищ. навч. закл. / В. О. Тіманюк, О. М. Животова. – Х.: вид – во НФаУ; Золоті сторінки, 2003. – С. 7 – 12.

ІОНІЗУЮЧІ ВИПРОМІНЮВАННЯ. ВИЗНАЧЕННЯ ФОНУ

Іонізуюче випромінювання – випромінювання, взаємодія якого з речовиною призводить до іонізації та/або збудження атомів і молекул. Процес іонізації супроводжується утворенням в цій речовині іонів різного знаку. Збудження атомів і молекул, викликане переведенням їхніх електронів у збуджений стан, призводить до підвищення реакційної здатності цих атомів і молекул, внаслідок появи в них неспарених електронів (вільнорадикальний стан). Виділяють два типи іонізуючих випромінювань – корпускулярні (частки характеризуються масою спокою, електричним зарядом та початковою енергією) і некорпускулярні (кванти характеризуються частотою або довжиною хвилі).

До корпускулярних випромінювань відносяться електрони, позитрони, протони, альфа-частки, пі-мезони, прискорені ядра елементів, аж до ядер ^{92}U , а також нейтрони. **До некорпускулярних** відносять рентгенівське, гама-випромінювання і синхротронне випромінювання.

Природний фон випромінювання – еквівалентна доза іонізуючого випромінювання, створюваного космічним випромінюванням і випромінюванням природно розподілених природних радіонуклідів у поверхневих шарах Землі, приземній атмосфері, продуктах харчування, воді й організмі людини.

Радіаційний рівень, що відповідає природному фону – 0,1 – 0,2 мкЗв/год, визнано вважати нормальним, рівень 0,2 – 0,6 мкЗв/год вважається припустимим, а рівень понад 0,6 – 1,2 мкЗв/год з урахуванням коефіцієнту екранування вважається підвищеним (коефіцієнт екранування показує в скільки разів зменшується рівень зовнішнього випромінювання. Для міського населення він дорівнює 4, для сільського – 2).

Середні значення ефективних еквівалентних доз опромінення, одержуваних щорічно окремими особами від природних джерел випромінювання в районах з нормальним фоном за даними МАГАТЕ наступні: радон – 1,3 мЗв, 55 %; космічні промені – 0,37 мЗв, 15,5 %; калій – 0,3 мЗв, 12,5 %; інші джерела – 0,4 мЗв, 17 %; усього – приблизно 2,4 мЗв (240 бер). Від штучних джерел випромінювання дані наступні: медичне використання – 0,4 – 1,0 мЗв; іспити ядерної зброї – 0,01 мЗв; виробництво енергії – 0,0002 мЗв; усього – приблизно 0,4 – 1,0 мЗв (40-100 мбер).

На даний момент відсутнє поняття цілком безпечних малих доз іонізуючого випромінювання, як і відсутня чітка концепція захисту від дії радіації і лікування променевої хвороби.

Для виявлення радіоактивності у середовищі використовують радіометричні установки. Основною частиною таких установок є лічильна трубка (лічильник Гейгера-Мюллера), що представляє собою циліндр, заповнений нейтральним газом (аргон). До металевої стінки циліндра подається негативна напруга, а до нитки, що проходить у центрі циліндра – позитивна напруга.

У лічильній трубці встановлюється знижений тиск (20 – 100 мм рт.ст.)

Коли у внутрішній об'єм лічильної трубки попадає ядерна частка, вона викликає первинну іонізацію. Електрони, що утворюються при цьому, рухаються до анода, іони аргону – до катода. На нитку трубки подається висока напруга, тому електрони отримують великі прискорення і викликають ударну іонізацію. Електрони, що дійшли до нитки-анода, осідають на ній і нейтралізуються. Позитивні іони аргону рухаються до катода, здобуваючи великі прискорення, і, вдаряючись об металевий катод (стінку), вибивають з нього більшу кількість електронів, чим необхідно для нейтралізації позитивних іонів. Вільні електрони направляються до нитки-анода, і потрапляючи в область високих напруг, у свою чергу створюють ударну іонізацію і т. п.

Крім того, деякі атоми аргону при зіткненні з ядерними частками або електронами не іонізуються, а переходять у збуджений стан (переходять на більш високий енергетичний рівень). Повертаючись до колишнього енергетичного рівню, такі атоми випромінюють ультрафіолетові промені. Кванти УФ-опромінення досягають катода і вибивають з нього електрони, що направляються до анода, де створюють ударну іонізацію. Таким чином, ударна іонізація ініціюється попаданням у внутрішній об'єм лічильника однієї ядерної частки і продовжується з усе більшою інтенсивністю. Число вторинноутворених іонів лавиноподібно наростає. Радіометр, до якого приєднана лічильна трубка, відзначає появу в лічильній трубці іонізаційного струму – реєструє імпульс.

Іонізація припиняється в лічильниках, що самогасяться, за допомогою парів багатоатомних спиртів, які знаходяться всередині трубки (спирт поглинає УФ-опромінення і за допомогою слабозв'язаного електрона нейтралізує позитивний іон аргону).

Лабораторна робота № 14

ВИЗНАЧЕННЯ ФОНУ

Мета: засвоїти методику визначення природного радіаційного фону за допомогою портативного лічильника.

Основні завдання:

Виміряти фонове природне випромінювання навколишнього середовища – аудиторій факультету, прилеглої до біологічного факультету території, гранітних фасадів будинків тощо.

Обладнання, апаратура, матеріали і реактиви:

1. Прилади: портативний лічильник радіоактивного випромінювання ДП-5Б.

Питання для підготовки та обговорення:

1. Описати область застосування мічених атомів у біології.
2. Навести приклади альфа, бета, гама - випромінювачів.

3. Написати кілька реакцій ядерного розпаду.
4. Як ви розумієте правило Бергоньє і Трибондо?
5. Охарактеризувати віддаленні наслідки опромінення.
6. Які ви знаєте модифікатори дії радіації?
7. Описати механізм функціонування лічильника Гейгера-Мюллера.

Хід роботи.

Фон – це кількість імпульсів, що реєструє радіометр без радіоактивного препарату. Ця величина визначається космічним випромінюванням, перебуванням незначної кількості ізотопів у навколишніх препаратах і т. п. Визначення фону проводять при роботі з міченими атомами на початку і наприкінці роботи. У побуті визначення фону проводять портативними пристроями, які вимірюють інтенсивність β - та γ -випромінювання від різних поверхонь. Вигляд радіометру БП-5Б наведено на рис. 11.

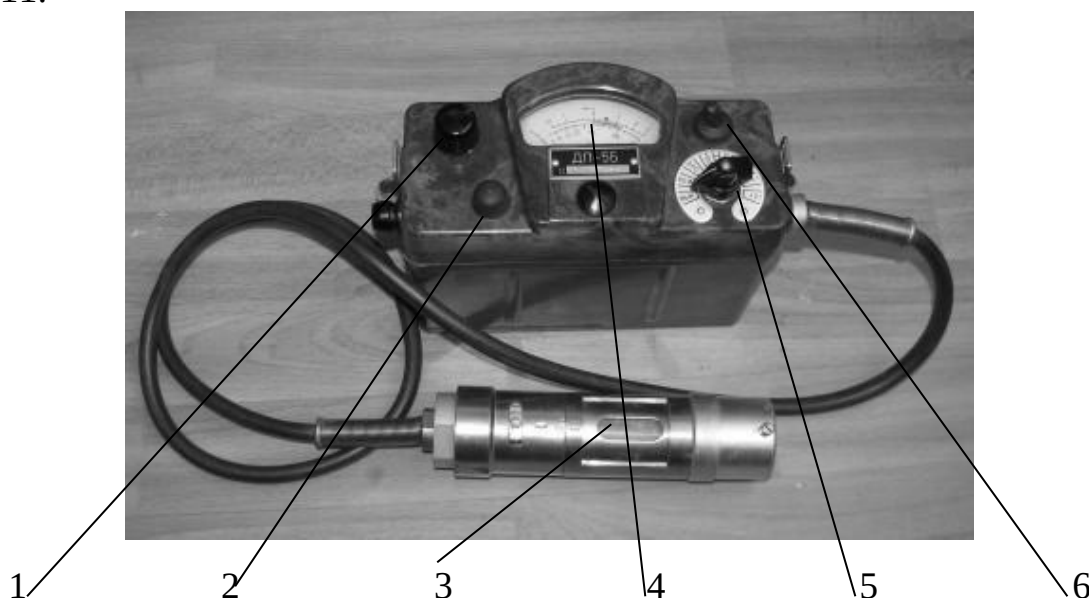


Рис. 11. Рентгенометр БП-5Б (<https://zapadpribor.com/ua/dp-5b/>).

Примітки. 1.ручка потенціометра «Режим»; 2. кнопка скидання показників «сброс» мікроамперметра. 3. Зонд-датчик з лічильником Гейзера. В ньому виконують перемикання між режимами вимірювань: Г (для гама-опромінення) та Б (для бета часток); 4.мікроамперметр; 5. перемикач піддиапазонів; 6. тумблер підсвічування шкал.

Пристрій увімкнути у положення «реж» та ручкою «режим» встановити стрілку приладу до мітки «▼» (рис. 11). Виміри γ -випромінювання почати з піддиапазону «200». Для виявлення β -випромінювання екран зонду переставити у положення «Б». Рентгени перевести у Зіверти, вважаючи, що $100 \text{ Р} = 1 \text{ Зв}$. Після закінчення вимірів прилад потрібно виключити.

Результати вимірів записати у таблицю 19:

Таблиця 19.

№	Об'єкт	Р / г	мкЗв/г
1.	Парта студента	0,00001	0,1
2.	...	...	...

Висновки: ...

Питання для контролю:

1. Що таке радіоактивність? Описати види радіоактивного розпаду.
2. Що таке іонізуючі випромінювання? Які вони бувають?
3. Які норми щодо іонізуючих випромінювань ви знаєте?
4. Охарактеризувати дози іонізуючих випромінювань.
5. Назвати та пояснити механізми взаємодії іонізуючих випромінювань з речовиною.
6. Пояснити особливості дії іонізуючих випромінювань на біооб'єкти.

Література до розділу:

1. Гродзинський Д.М. Радіобіологія: Підручник. – 2-ге вид. / Д.М. Гродзинський. – К.: Либідь, 2001. – С. 49 – 93.
2. Медична і біологічна фізика: Навчальний посібник для студентів спеціальності 222 «Медицина» / Е.І. Сливко, О.З. Мельнікова, О.З. Іванченко, Н.С. Біляк. – Запоріжжя, 2018. – С. 252 – 289.
3. Методичні вказівки для самостійної роботи студентів, лабораторні роботи та завдання із курсу біофізики (Для студентів біологічного факультету усіх форм навчання) / Укладачі: О.В. Запорожченко, Л.М. Карпов, С.А. Петров, О.К. Будняк, Н.Л. Федорко. – Одеса, 2003. – 38 – 47.

Орієнтовні тести для самоконтролю

Тест складається з 50 тестових завдань із вибором **однієї** правильної відповіді. До кожного із завдань пропонується 5 альтернативних відповідей.

За правильне виконання одного тестового завдання можна отримати 2 бала. Мінімальна кількість балів – 50, максимальна кількість балів, яку можна набрати, правильно виконавши всі завдання тесту – 100.

1. Біофізика – це наука, яка: а) застосовує фізичні методи досліджень; б) досліджує фізичні явища в біологічних об'єктах; в) досліджує фізичні і фізико-хімічні процеси в живих системах; г) досліджує перетворення енергії; д) досліджує швидкість хімічних реакцій.
2. Термодинаміка – це наука, яка займається вивченням: а) роботи; б) ентропії; в) теплоти; г) перетворення різних видів енергії; д) немає вірної відповіді.
3. Ізольована термодинамічна система з навколишнім середовищем обмінюється: а) масою та енергією; б) тільки масою; в) тільки енергією; г) не обмінюється ні масою, ні енергією; д) не містить матеріальної оболонки.
4. Відкрита термодинамічна система обмінюється з навколишнім середовищем: а) масою та енергією; б) тільки масою; в) тільки енергією; г) не обмінюється ні масою, ні енергією; д) не містить матеріальної оболонки.
5. Закрита термодинамічна система з навколишнім середовищем обмінюється: а) масою та енергією; б) тільки масою; в) тільки енергією; г) не обмінюється ні масою, ні енергією; д) не містить матеріальної оболонки.
6. Перший закон термодинаміки стверджує, що: а) $\Delta U=0$; б) $U=0$; в) $U=1$; г) $dU=Q\pm dW$; д) $H=dU+pV$.

7. Ентальпія – це...

- а) міра впорядковості системи;
- б) збереження енергії;
- в) дихальний коефіцієнт;
- г) тепловміст системи;
- д) енергетичний коефіцієнт.

8. Ентропія – це:

- а) кількість тепла, внесеного в термодинамічну систему;
- б) зміна температури;
- в) міра неупорядкованості термодинамічної системи;
- г) міра впорядкованості термодинамічної системи;
- д) приріст тепла.

9. Екзергонічні процеси відбуваються:

- а) з виділенням енергії у формі корисної роботи;
- б) без зміни енергії;
- в) з поглинанням енергії у формі корисної роботи;
- г) з поглинанням енергії;
- д) з поглинанням тепла.

10. Швидкість хімічних реакцій – це зміна:

- а) тиску за одиницю часу;
- б) об'єму однієї з реагуючих речовин за одиницю часу;
- в) концентрації однієї з реагуючих речовин за одиницю часу;
- г) структури;
- д) молекулярної маси.

11. Рівняння Міхаеліса-Ментен має вигляд:

а) $\frac{dm}{dt} = -DS \left(\frac{dc}{dx} \right)$

б) $k = -Ae^{\left(\frac{-E_a}{RT} \right)}$

в) $\frac{dV}{dt} = \Delta p \left(\frac{\pi r^4}{8\eta l} \right)$

г) $V = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$

д) $K = \frac{k_{-1} + k_1}{k_2}$

12. Константа Міхаеліса K_m – це:

- а) така швидкість реакції, за якої концентрація субстрату дорівнює половині максимальної;

б) така швидкість реакції, за якої концентрація субстрату є максимальна; в) така концентрація субстрату, при якій швидкість реакції дорівнює половині максимальної; г) така концентрація субстрату, за якої швидкість реакції рівна 0; д) така концентрація субстрату, при якій швидкість реакції дорівнює максимальній.
13. Вказати властивості константи Міхаеліса: а) не змінюється в присутності інгібіторів незалежно від їх природи; б) зростає під дією конкурентного інгібітору; в) зменшується під дією неконкурентного інгібітору; г) збільшується під дією неконкурентного інгібітору; д) зменшується під дією конкурентного інгібітору
14. Вказати координати графіка Лайнуївера-Берка: а) $[1/[s]; 1/V]$ б) $[[I]; 1/V]$ в) $[[s]; V]$ г) $[1/T; \ln k]$ д) $[1/[s]; 1/[I]]$
15. Рівняння Арреніуса має вигляд: а) $\frac{dm}{dt} = -DS \left(\frac{dc}{dx} \right)$ б) $k = -Ae^{\left(\frac{-E_a}{RT} \right)}$ в) $\frac{dV}{dt} = \Delta p \left(\frac{\pi r^4}{8\eta l} \right)$ г) $V = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$ д) $K = \frac{k_{-1} + k_1}{k_2}$
16. Статична теорія Фішера: а) через конформаційну перебудову активного центру відбувається точна орієнтація каталітичних груп ферменту для перетворення субстрату; б) фермент і субстрат взаємодіють між собою як ключ і замок;

	в) активний центр ферменту і субстрат коливаються в резонанс; г) будь-яка система, що перебуває у стані рівноваги й відхиляється від нього під дією зовнішнього збурення, намагатиметься довільно повернутись у рівноважний стан за рахунок зміни параметрів системи в напрямку, протилежному тому, який викликав збурення; д) потік незаряджених частинок через одиницю площі за певний проміжок часу для даного виду частин є величина стала.
17.	Індукована модель Кошланда: а) через конформаційну перебудову активного центру відбувається точна орієнтація каталітичних груп ферменту для перетворення субстрату; б) фермент і субстрат взаємодіють між собою як ключ і замок; в) активний центр ферменту і субстрат коливаються в резонанс; г) будь-яка система, яка перебуває у стані рівноваги й відхиляється від нього під дією зовнішнього збурення, намагатиметься довільно повернутись у рівноважний стан за рахунок зміни параметрів системи в напрямку, протилежному тому, який викликав збурення; д) потік незаряджених частинок через одиницю площі за певний проміжок часу для даного виду частин є величина стала.
18.	Енергетичний бар'єр, який переборюють молекули для здійснення реакції – це: а) константа швидкості реакції; б) порядок реакції; в) експоненціальний множник; г) енергія активації; д) теорія перехідного стану.
19.	Теорія яка пояснює хімічні реакції й ферментативні реакції в розчині: а) теорія неперехідного стану; б) динамічна теорія; в) статична теорія; г) теорія абсолютних швидкостей реакцій; д) теорія Крамерса.
20.	Яка з моделей алостеричних ферментів пояснює від'ємну кооперативність? а) симетрична модель Кошлана-Моно; б) симетрична модель Моно-Уаймена-Шанже; в) послідовна модель Моно; г) послідовна модель Фішера; д) послідовна модель Кошланда-Неметі-Філмера.
21.	Яка з моделей алостеричних ферментів пояснює існування ферменту у напруженому та релаксованому станах? а) симетрична модель Кошлана-Моно; б) симетрична модель Моно-Уаймена-Шанже; в) послідовна модель Моно; г) послідовна модель Фішера; д) послідовна модель Кошланда-Неметі-Філмера.
22.	Згідно з математичним виразом закону Фіка, коефіцієнт дифузії – це...

а) функція від часу; б) константа; в) прямо пропорційний концентрації речовини; г) прямо пропорційний різниці концентрацій речовин в двох координатах; д) функція від швидкості.
23. Згідно з законом Фіка для дифузії швидкість дифундуючої речовини.... . а) обернено пропорційна різниці концентрацій двох речовин; б) не залежить від різниці концентрацій речовини; в) прямо пропорційна різниці концентрацій речовини; г) прямо пропорційна різниці концентрацій двох речовин; д) обернено пропорційна квадрату різниці концентрацій речовин.
24. Обрати характеристики, притаманні пасивному транспорту: а) здійснюється за градієнтом концентрації речовини, що транспортується; б) здійснюється проти градієнта концентрації; в) є енергозалежним; г) є енергонезалежним.
25. Вказати види пасивного транспорту: а) проста дифузія; б) полегшена дифузія; в) фагоцитоз; г) піноцитоз; д) ендоцитоз.
26. Визначити, за рахунок чого здійснюється вторинно-активний транспорт крізь біологічні мембрани: а) прямий гідроліз АТФ; б) енергії, яка накопичується за рахунок іонних градієнтів; в) прямого гідролізу креатинфосфату; г) синтезу АТФ; д) за рахунок окисного фосфорилування.
27. Обрати механізм, за яким відбувається процес одночасного й односпрямованого перенесення двох речовин через біологічну мембрану: а) антипорт; б) вторинно-активний транспорт; в) симпорт; г) контранспорт; д) уніпорт.
28. Визначити роль Na^+, K^+-АТФази у клітині: а) синтез АТФ; б) створення електрохімічного градієнта на мембрані; в) підтримання онкотичної рівноваги; г) транспорт іонів K^+ та Na^+ проти їх градієнта концентрації; д) розрядження мембрани.
29. Обрати процес, який забезпечує регуляцію вмісту іонів Ca^{2+} у клітині: а) полегшена дифузія; б) проста дифузія;

	в) симпорт з іонами K^+ ; г) антипорт з іонами Na^+ ; д) робота Ca^{2+} -АТФази.
30. Визначити, що таке уніпорт:	а) транспорт двох речовин в одному напрямку; б) транспорт двох речовин у протилежних напрямках; в) транспорт однієї речовини в одному напрямку; г) транспорт трьох речовин у будь-якому напрямку; д) транспорт двох речовин у будь-якому напрямку.
31. Визначити фактори, що обумовлюють текучість біологічних мембран:	а) розмір білкових молекул; б) довжина вуглеводних радикалів вищих жирних кислот; в) природа вуглецевого компоненту; г) ступінь ненасичення вищих жирних кислот; д) наявність нейтральних ліпідів.
32. Залежність оптичної густини ДНК від температури називають:	а) прямою плавлення ДНК; б) кривою ДНК; в) оптичною густиною; г) кривою плавлення ДНК; д) кривою плавлення нуклеотидів.
33. Гіперхромний ефект ДНК виникає за рахунок розривів:	а) електростатичних і водневих взаємодій; б) вертикальних зв'язків і стекінг-взаємодій; в) нуклеотидних взаємодій; г) пептидних і водневих зв'язків; д) диполь-дипольних взаємодій;
34. Позитивний потенціал реверсії при виникненні потенціалу дії (фаза деполяризації) має:	а) хлорну природу; б) природу, не пов'язану з іонами натрію; в) калієву природу; г) натрієву природу; д) кальцієву природу.
35. Як змінюється проникнення іонів калію або натрію через мембрану у фазу деполяризації потенціалу дії?	а) бурхливе проникнення іонів натрію всередину нервового волокна; б) бурхливе проникнення іонів калію всередину нервового волокна; в) вихід іонів калію з нервового волокна; г) вихід іонів натрію з нервового волокна; д) одночасний вихід іонів натрію і калію з нервового волокна.
36. Для якого типу іонних каналів неорганічні катіони використовують як блокатори?	а) Т-типу Ca^{2+} -каналів; б) потенціалзалежних K^+ -каналів;

в) ліганкерованих Ca^{2+}-каналів; г) потенціалзалежних хлорних каналів; д) Ca^{2+}-АТФази.
37. За генерацію потенціалів дії у плазматичних мембранах електрично збудливих клітин відповідають: а) потенціалзалежні воротні іонні канали; б) латеральна і трансмембранна дифузія; в) пори заповнені водою; г) білки-переносники; д) фазові переходи в мембрані.
38. Гіперполяризація – це: а) збільшення мембранної різниці потенціалів; б) зменшення мембранної різниці потенціалів; в) зміна знаку заряду в середині клітини; г) зміна знаку заряду ззовні клітини; д) немає вірної відповіді.
39. Для виникнення потенціалу дії при дії на клітину електричним струмом електроди розміщуються таким чином: а) анод – всередині клітини, катод – ззовні; б) анод – ззовні клітини, катод – ззовні клітини; в) анод – всередині клітини, катод – всередині клітини; г) катод – всередині клітини, анод – ззовні; д) немає вірної відповіді.
40. Радіоактивність це.... а) спонтанне випромінювання речовиною заряджених і незаряджених частинок; б) спонтанне перетворення нестійких молекул, до складу яких входять радіоактивні ізотопи, з виділенням частинок і високоенергетичного електромагнітного випромінювання; в) спонтанне перетворення нестійких ізотопів одного хімічного елемента в ізотопи іншого елемента з виділенням частинок і високоенергетичного електромагнітного випромінювання; г) спонтанне перетворення нестійких молекул, з виділенням тепла.
41. Різновид атомів, ядра яких мають фіксоване число протонів і нейтронів, називають: а) ізотопами; б) ізобарами; в) ізотонами; г) нуклідами; д) ізомерами.
42. Різновид атомів, ядра яких містять різну кількість протонів і нейтронів, називають: а) ізобарами; б) ізотонами; в) ізотопами; г) нуклідами; д) немає вірної відповіді.

43. Різновид атомів, ядра яких мають різний склад, але містять однакову кількість нуклонів, називають: а) ізотопами; б) ізобарами; в) ізотонами; г) нуклідами; д) немає вірної відповіді.
44. α-частинку відносять до: а) лептонів; б) вона не є елементарною частинкою; в) адронів; г) глюонів; д) мезонів.
45. Як називається самодовільне перетворення ядер, внаслідок якого вилітає ядро атома гелію: а) γ-розпад; б) β-розпад; в) α-розпад; г) протонний розпад; д) немає вірної відповіді.
46. Де проходження іонізуючої частинки реєструється за виникненням імпульсу електричного струму внаслідок виникнення самостійного розряду в газі: а) в іонізаційній камері; б) у бульбашковій камері; в) у камері Вільсона; г) у лічильнику Гейгера-Мюллера; д) у сцинтиляційному лічильнику.
47. За внутрішнього опромінення людини найбільш шкідливими є: а) електромагнітні хвилі мікрохвильового діапазону; б) β-випромінювання; в) γ-випромінювання; г) α-випромінювання; д) усі однаково шкідливі.
48. За зовнішнього опромінення людини найбільш шкідливими є: а) електромагнітні хвилі мікрохвильового діапазону; б) β-випромінювання; в) γ-випромінювання; г) α-випромінювання; д) усі однаково шкідливі.
49. Визначити процеси, з активацією яких пов'язаний основний механізм радіаційного пошкодження біологічних мембран: а) процеси вільнорадикального окиснення залишків жирних кислот у фосфоліпідах, що входять до їхнього складу; б) процеси розпаду білків;

- в) порушення роботи іонних насосів;
- г) всі відповіді вірні;
- д) немає вірної відповіді.

50. Щоб отримати рентгенівський знімок грудної клітки людини використовують:

- а) синхротронне випромінювання;
- б) гальмівне рентгенівське випромінювання;
- в) мікрохвильове випромінювання;
- г) неіонізуюче випромінювання;
- д) характеристичне рентгенівське випромінювання.

ЛІТЕРАТУРА

1. Біофізика і біомеханіка : підруч. / В. С. Антонюк, М. О. Бондаренко, В. А. Ващенко та ін. – К.: НТУУ "КП", 2012. – 344 с.
2. Біофізика. Ферментативна кінетика. Динамічні моделі біологічних процесів. Теорія. Лабораторний практикум. Для студентів спеціальності «Біологія» // О. І. Доценко, Г. В. Тарадіна. – Вінниця, ДонНУ імені Василя Стуса, 2017. – 183 с.
3. Біофізика. Фізичні методи аналізу та метрологія : підручник / Е.І. Личковський, В.О. Тіманюк, О.В. Чалий [та ін.] ; за ред. Е.І. Личковського, В.О.Тіманюка. – Вінниця : Нова книга, 2014. – 464 с.
4. Гродзинський Д.М. Радіобіологія: Підручник. – 2-ге вид. / Д.М. Гродзинський. – К.: Либідь, 2001. – 448 с.
5. Ємчик Л.Ф. Медична біофізика. Інтегрований курс лекцій. Навч. посібник / Л.Ф. Ємчик, Я.М. Кміт ; за ред. проф. У. С. Гончаренка. – Львів: Місіонер, 1988. – 216 с.
6. Зима В.Л. Біофізика. Практикум: Навчальний посібник / В.Л. Зима, М.С. Мірошніченко, Т.Л. Давидовська, В.П. Ганчурін, Ю.І. Прилуцький. – К.: Видавничо-поліграфічний центр "Київський університет", 2003. – 139 с.
7. Костюк П.Г. Биофизика / П.Г. Костюк, Д.М. Гроздинский, В.Л. Зима и др. – Киев: Вища школа, 1989. – 504 с.
8. Медична і біологічна фізика: Навчальний посібник для студентів спеціальності 222 «Медицина» / Е.І. Сливко, О.З. Мельнікова, О.З. Іванченко, Н.С. Біляк. – Запоріжжя, 2018. – 291 с.
9. Медична та біологічна фізика : підручник для студ. вищих мед. (фарм.) навч. заклад. / [О. В. Чалий, Я. В. Цехмістер, Б. Т. Агапов та ін.] ; за ред. проф. О. В. Чалого. — Вид. 2-ге. — Вінниця : Нова Книга, 2017. — 528 с.
10. Методичні вказівки для самостійної роботи студентів, лабораторні роботи та завдання із курсу біофізики (Для студентів біологічного факультету усіх форм навчання) / О.В. Запорожченко, Л.М. Карпов, С.А. Петров, О.К. Будняк, Н.Л. Федорко. – Одеса, 2003. – 52 с.
11. Практикум з біофізики : навч. посіб. : [для студ. вищ. навч. закл.] / А.В. Тарновська, М.Б. Галан, Н.П. Головчак, М.В. Бура, Д.І. Санагурський. – Львів : ЛНУ імені Івана Франка, 2011. – 182 с.
12. Терещенко М.Ф. Біофізика: підручник / М. Ф.Терещенко, Г. С. Тимчик, І. О. Яковенко. - Київ: КПІ ім. Ігоря Сікорського, Вид-во «Політехніка», 2019. – 444 с.
13. Тіманюк В. О. Біофізика: Підруч. для студ. вищ. навч. закл. / В. О. Тіманюк, О. М. Животова. – Х.: вид – во НФаУ; Золоті сторінки, 2003. – 704 с.

Навчальне видання

**Сорокін Андрій Вікторович,
Будняк Олександр Костянтинович,
Чернадчук Сніжана Сергіївна,
Федорко Наталія Леонідівна,
Запорожченко Олександр Вікторович,
Андрієвський Олександр Михайлович,
Петров Сергій Анатолійович.**

Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт з курсу «Біофізика»

для здобувачів вищої освіти спеціальностей 091 «Біологія»,
162 «Біотехнології і біоінженерія»

Оригінал-макет розроблено в авторській редакції

Кафедра біохімії
Біологічний факультет
Одеський національний університет імені І. І. Мечникова
Шампанський провулок, м. Одеса, 65058