

Государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«Сибирский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения
Российской Федерации

**РУКОВОДСТВО
К ПРАКТИЧЕСКИМ ЗАНЯТИЯМ
ПО ОБЩЕЙ И МЕДИЦИНСКОЙ БИОФИЗИКЕ**

под редакцией проф. М.Б. Баскакова

Учебное пособие в 2 частях
Часть 1

Томск
Сибирский государственный медицинский университет
2013

УДК 577.3(078.8)
ББК Е901я73
Р851

Авторы

профессора кафедры биофизики и функциональной диагностики СибГМУ д-р биол. наук **И.В. Петрова**, д-р мед. наук **А.В. Носарев**, д-р мед. наук **И.В. Ковалев**, доценты кафедры биофизики и функциональной диагностики СибГМУ канд. мед. наук **С.В. Гусакова**, канд. хим. наук **Т.А. Бородина**.

Р851 Руководство к практическим занятиям по общей и медицинской биофизике : учебное пособие в 2 частях. Ч. 1./ под ред. проф. М. Б. Баскакова. – Томск : СибГМУ, 2013. – 125 с.

Учебное пособие подготовлено в соответствии с Федеральным Государственным образовательным стандартом высшего профессионального образования (ФГОС ВПО) 2011 года по специальностям 060601-Медицинская биохимия, 060602-Медицинская биофизика и 060609-Медицинская кибернетика. Включает описание практических работ по 14 темам курса «Общая и медицинская биофизика». В описание практических занятий вошли теоретические основы используемых методов, практические подходы для выполнения работы, методы расчета исследуемых параметров, образцы таблиц, графиков, гистограмм, которые обучающиеся должны построить по полученным результатам, а также вопросы для самоподготовки к занятию, контрольные вопросы, тестовые задания и ситуационные задачи.

УДК 577.3(078.8)
ББК Е901я73

Рецензент д-р мед. наук, профессор **Л.В. Капилевич**

Утверждено и рекомендовано к печати учебно-методической комиссией медико-биологического факультета (протокол № 11 от 17 января 2012 г.) и Центральным методическим советом ГБОУ ВПО СибГМУ (протокол № 2 от 27 июня 2012 г.)

© Петрова И.В., Носарев А.В., Ковалев И.В,
Гусакова С.В., Бородина Т.А., 2013
© Сибирский государственный медицинский университет, 2013

ОГЛАВЛЕНИЕ

Тема 1. Методы статистической обработки результатов биофизического эксперимента	4
Тема 2. Определение размеров биомакромолекул методом монослоев	20
Тема 3. Осмотическое давление биологических жидкостей	27
Тема 4. Исследование набухания биологических тканей весовым методом	36
Тема 5. Метод фотоэлектроколориметрии	43
Тема 6. Спектры поглощения белков	52
Тема 7. Исследование диффузии веществ через полупроницаемую мембрану	58
Тема 8. Определение рК аминокислот	64
Тема 9. Потенциометрическое титрование белков	73
Тема 10. Определение зависимости поверхностного натяжения монослоя легочного сурфактанта от размеров его поверхности	79
Тема 11. Исследование биологических поверхностно-активных веществ	87
Тема 12. Исследование поверхностного натяжения различных жидкостей методом отрыва кольца	94
Тема 13. Буферная емкость компонентов крови	100
Тема 14. Исследование осмотического гемолиза эритроцитов ...	108
Эталоны ответов к тестовым заданиям	116
Эталоны ответов к ситуационным задачам	119
Рекомендуемая литература	124

Тема 1

МЕТОДЫ СТАТИСТИЧЕСКОЙ ОБРАБОТКИ РЕЗУЛЬТАТОВ БИОФИЗИЧЕСКОГО ЭКСПЕРИМЕНТА

Цель: Освоить методы статистической обработки результатов медико-биологических исследований.

Материалы и оборудование: секундомер.

Вопросы для самоподготовки:

1. Основные статистические характеристики, используемые для анализа медико-биологических исследований.
2. Различие параметрических и непараметрических параметров.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Статистическая обработка результатов включает оценку достоверности полученных данных, установление закономерности или случайности различий между группами, выявление связи между параметрами. Грамотно проведенная статистическая обработка результатов позволяет сделать обоснованные и верные выводы из полученных результатов.

Дисперсионный анализ

Биологическим явлениям присуща некоторая изменчивость, поэтому числовая характеристика признака не дает права считать полученную величину типичной для данного явления. В связи с этим необходимо найти типичную, свойственную большинству объектов наблюдения числовую характеристику. Такой характеристикой является **средняя арифметическая** вариационного ряда (M). Она определяется по формуле:

ся по формуле:
$$\bar{X} = \frac{1}{n} \sum X_i$$

Наряду со средней арифметической для полного описания явления необходимо использовать числовые характеристики изменчивости процесса.

Для этого необходимо ввести некоторые понятия.

ОТКЛОНЕНИЕМ α_i любой варианты x_i от некоторого постоянного числа (a) называется разность:

$$\alpha_i = x_i - a$$

Отклонение вариант от средней арифметической называют центральным, так как в качестве постоянного числа a выбран центр распределения – его средняя арифметическая M . Центральное отклонение находится по формуле:

$$D_i = x_i - M$$

Практическое применение имеет свойство центральных отклонений: их алгебраическая сумма равна 0. Это свойство используется для проверки правильности подсчета центральных отклонений. Сумма квадратов центральных отклонений находится по формуле:

$$\alpha = \sum (x_i - M)^2$$

Теперь введем важное для дальнейших расчетов понятие *дисперсии*, которая определяется по формуле:

$$\sigma^2 = \pm \frac{\alpha}{n-1} = \frac{\alpha}{f}$$

Величина $f = (n-1)$ – число степеней свободы. Она указывает на число независимых величин, участвующих в определении соответствующей характеристики.

Основной же числовой характеристикой изменчивости процесса служит *среднеквадратическое отклонение* (σ), определяемое как корень квадратный из дисперсии:

$$\sigma = \pm \sqrt{\sigma^2} = \pm \sqrt{\frac{\alpha}{n-1}}$$

Среднеквадратическое отклонение (σ) является основной мерой рассеяния числовых значений вариант, определяет степень их группировки вокруг средней арифметической.

Малое значение σ указывает на достаточно высокую точность применяемой методики. Большое значение σ говорит, что процесс очень изменчив. Это может быть вызвано рядом причин, затрудняющих исследование влияние основного фактора на процесс.

Величина среднеквадратического отклонения указывает границы числовых значений, в пределах которых сосредотачивается наибольшая часть вариант ($M \pm \sigma$).

Средняя арифметическая (M) вариационного ряда не является постоянной величиной, а меняется от одной выборки к другой. Мерой изменчивости выборочной средней арифметической является так называемая *ошибка средней арифметической* (m). Она определяется по формуле:

$$m = \pm \frac{\sigma}{\sqrt{n}} = \pm \sqrt{\frac{\alpha}{n(n-1)}}$$

Важность этой характеристики состоит в том, что она позволяет определить, в какой мере найденная средняя арифметическая отличается от истинной.

При биологических исследованиях всякая полученная величина должна учитываться и приниматься в расчет. Если при изучении какого-либо явления на общем фоне более или менее однородных величин проявляются резко выделяющиеся, то это, видимо, говорит о влиянии какого-либо нового фактора, дающего резкие колебания величин. Из теории математической статистики следует, что, если в вариационном ряду отклонение какой-либо из вариантов от средней арифметической, взятое со знаком «плюс», превосходит среднеквадратическое отклонение более чем в 3 раза, то такую величину можно рассматривать как нетипичную. В таких случаях ее исключают из общих расчетов.

Порядок исключения следующий. Подсчитывают M и σ без учета сомнительной варианты. Если отклонение этой варианты от M больше 3σ , то ее отбрасывают. Если же отклонение меньше 3σ , то сомнительную варианту вновь включают в ряд и снова подсчитывают M и σ .

Качественную сторону изменчивого процесса наглядно показывают так называемые кривые распределения. В то же время они позволяют сделать ряд выводов и о количественных характеристиках процесса. Кривые распределения называются эмпирическими, если для их построения используют непосредственные опытные данные. Эмпирические кривые, построенные для разных выборок, будут несколько различными. При неограниченном объеме выборки эмпирическая кривая распределения, постепенно меняясь, перейдет в так называемую теоретическую кривую распределения.

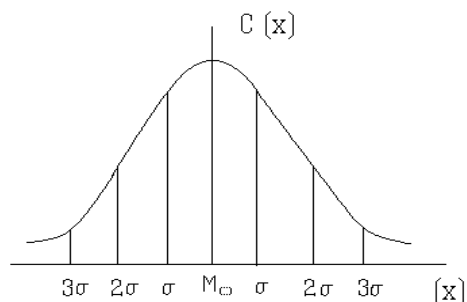


Рис. 1. Кривая нормального распределения Гаусса

Многочисленными исследованиями установлено, что большинство явлений имеет эмпирические кривые, близкие по виду к кривой нормального распределения, или распределения Гаусса (рис. 1).

По оси ординат отложена частота встречаемости признака $C(x)$, по оси абсцисс – полученные в опыте варианты (x) . Кривая симметрична относительно центра. Им является средняя арифметическая генеральной совокупности – *математическое ожидание M* . Наибольшее значение частоты приходится на центр симметрии кривой. Крутизна спада ветвей к оси абсцисс зависит от σ .

Площадь, ограниченная кривой нормального распределения и осью абсцисс, равна 1. Часть площади, находящаяся под любым интервалом оси ограниченная сверху кривой распределения, равна вероятности попадания вариантов в данный интервал. Было подсчитано, что вероятность попадания в интервал $(M_0 - \sigma; M_0 + \sigma)$ равна 0,68, т. е. 68 % вариантов попадает в указанный интервал. Аналогично, в 95 % случаев попадают в интервал $(M_0 - 2\sigma; M_0 + 2\sigma)$, а в 99 % случаев они будут сосредоточены в интервале $(M_0 - 3\sigma; M_0 + 3\sigma)$. Значения вариантов, выходящие за пределы этого интервала, настолько редко встречаются (вероятность равна 0,0027), что их появление считается практически невозможным. На этом основано правило 3σ (см. выше).

Широкое применение при анализе результатов медико-биологических исследований находит распределение Стьюдента, являющееся частным случаем нормального распределения. Оно используется для сравнения рядов при малом количестве вариантов (меньше 30).

Все выборочные характеристики процесса (M , σ , m и др.), полученные при обследовании конечных групп объектов, не абсолютно точны, а являются приближением к таковым генеральной совокупности.

сти (т. е. такой совокупности, в которой число элементов бесконечно велико). Но по известной выборочной характеристике можно указать границы числовых значений, в пределах которой с достаточной вероятностью находится характеристика генеральной совокупности. Эта область называется **доверительным интервалом**. Величина допустимой ошибки в предположении, что характеристика генеральной совокупности попадает в пределы доверительного интервала, определяется ее вероятностью и называется **уровнем значимости P** .

Для наших целей вероятность удобно определить как количественную меру частоты правильности того или иного утверждения.

Например, мы говорим, что данное событие произойдет с вероятностью 0,95. Это значит, что наше утверждение будет правильным в среднем в 95 случаях из 100. В среднем только в 5 % наше утверждение будет неверным. Иначе говоря, вероятность ошибки $p=1-0,95=0,05$ или 5 %. Выбор того или иного уровня значимости в некоторой мере произволен и определяется важностью решаемой проблемы. В практике медико-биологических исследований общеприняты уровни значимости 1 и 5 %, которым соответствуют вероятности ошибочного вывода $p \leq 0,01$ и $p \leq 0,05$.

Часто перед исследователем стоит задача: действительно ли изучаемый фактор (физическая нагрузка, облучение УФ, введение лекарственного препарата и т. д.) оказывает влияние на объект. При малом числе наблюдений вопрос о достоверности различий требует привлечения специальных критериев, которые подразделяются на параметрические и непараметрические.

Параметрическими называются критерии, которые оценивают различия между параметрами выборочных совокупностей, распределение которых подчиняется закону нормального распределения (см. выше). Наиболее распространенным является критерий Стьюдента (t). Существует 3 способа его применения в зависимости от условий опыта:

а) определение коэффициента достоверности (t) для разностных вариационных рядов.

Если исследуют динамику какого-то процесса на одной и той же группе, то пользуются методом парных сравнений. Вместо двух вариационных рядов, характеризующих процесс до и после влияния фактора, обрабатывают один разностный ряд, составленный из разности числовых значений каждой пары вариант.

Порядок вычисления M и m обычный. Коэффициент достоверности t определяют по формуле:

$$t = \frac{M}{m}$$

Число степеней свободы f равно: $f=n-1$.

Вычисленное значение коэффициента t сравнивают с табличным (см. приложение), находящимся на пересечении строки, соответствующей числу степеней свободы и столбца, соответствующему заданному уровню значимости p . Если значение вычисленного коэффициента больше табличного, то достоверность различия считают установленной с уровнем p .

б) определение коэффициента достоверности для рядов, имеющих одинаковое количество вариантов ($n_1=n_2$).

Если контрольная и опытная группы состоят из одинакового числа объектов, то коэффициент определяют по формуле:

$$t = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{m^2_{x_1} + m^2_{x_2}}}, \text{ где}$$

X_1 и X_2 – средние арифметические первого и второго рядов;

m_1 и m_2 – ошибки средней арифметической первого и второго рядов.

Число степеней свободы f равно: $f=2(n-1)$.

Определение, достоверны или нет различия между рядами, производится при сравнении вычисленных и табличных значений (как описано в пункте а). Для выборок, распределение вариантов в которых не подчиняется закону нормального распределения, используются **непараметрические критерии**.

Корреляционный и регрессионный анализы

Эти разновидности статистического анализа позволяют определить наличие или отсутствие, а также характер функциональной связи между двумя выборками. Все многообразие связей между признаками можно разделить на две большие группы: статистические и функциональные. Первая группа объединяет зависимости, имеющие относительный или статистический характер. Их особенностью является следующее: одному и тому же значению первого признака может соответствовать ряд случайных числовых значений другого признака. Вторая группа связей характеризуется тем, что каждому числовому значению одного признака соответствует одно определенное число-

вое значение другого признака. Функциональную связь можно представить уравнением или формулой связи.

Статистические связи. Для изучения связей между какими-либо признаками берут определенную выборку и определяют для каждого объекта числовые значения изучаемых признаков. В результате получают два ряда числовых значений. Каждая пара числовых значений признаков, полученных на одном объекте, называется коррелирующей парой.

Каждую пару можно изобразить в виде точки на координатной плоскости. По оси абсцисс откладывают числовые значения первого признака, по оси ординат – второго. Построенная таким образом совокупность из точек называется точечной диаграммой. При возрастании числовых значений одного признака с ростом второго говорят о прямой связи между признаками. Если числовые значения второго признака убывают с ростом первого, то говорят об обратной связи.

Функциональные связи. Чтобы глубже понять характер связи, необходимо абстрагировать реальную связь, т. е. заменить ее приближенной функциональной зависимостью и определить числовые параметры этой зависимости.

1) линейная зависимость описывается уравнением:

$$y = bx + C$$

Коэффициент **b** определяет угол наклона прямой; коэффициент **C** показывает значение функции при $x=0$.

2) гиперболическая зависимость описывается уравнением:

$$y = \frac{b}{x} + C$$

3) параболическая зависимость описывается уравнением:

$$y = ax^2 + bx + C$$

Точечная диаграмма дает наглядную, но при этом грубую картину исследуемой связи. В то же время часто необходимы конкретные числовые характеристики статистической связи, которые позволяют точно определить, в какой мере проявляется связь и каков ее характер. Показателем степени связи между явлениями и ее силы служит *коэффициент корреляции (r)*. Он определяется формулой:

$$r_{x,y} = \frac{\tau}{\sqrt{\alpha_x \alpha_y}}, \text{ где}$$

τ – сумма произведений центральных отклонений коррелирующих пар;

α_x и α_y – суммы квадратов центральных отклонений, соответственно, первого и второго рядов.

Сумма квадратов центральных отклонений рассчитывается по формуле:

$$\alpha = \sum (x_i - M)^2$$

Сумма произведения центральных отклонений определяется:

$$\tau = \sum (x_i - M_x)(y_i - M_y), \text{ где}$$

M_x и M_y – средние арифметические коррелирующих рядов.

Значения коэффициента корреляции колеблются в пределах от -1 до +1. Положительные значения указывают на прямую связь между признаками, а отрицательные значения – на обратную корреляцию. Числовые значения, близкие к 1, говорят о наличии тесной связи между признаками, а близкие к 0 – о слабой корреляции. Коэффициент корреляции является надежным показателем лишь в случае линейной связи. Если связь нелинейная, он может указывать на отсутствие связи, в то время как она существует.

Как количественная мера силы корреляционной связи любого характера принимается *корреляционное отношение*. Оно определяется по формуле:

$$\rho_y = \frac{\sqrt{\bar{\alpha}_y}}{\alpha_y}, \text{ где}$$

ρ_y – корреляционное отношение, характеризующее степень зависимости значений x от y ;

$\bar{\alpha}_y$ (с чертой) – межгрупповая сумма квадратов центральных отклонений;

α_y – сумма квадратов центральных отклонений всего ряда.

Значения корреляционного отношения колеблются от 0 до 1, но не могут быть меньше числового значения коэффициента корреляции. Чем ближе ρ_y к 0, тем слабее связь и, наоборот, чем ближе ρ_y к 1, тем связь сильнее. Если $\rho_y=1$, связь строго функциональна, если $\rho_y=0$, связь отсутствует. При $\rho_y=r$ связь имеет линейный характер.

Межгрупповая сумма квадратов центральных отклонений определяется по формуле:

$$\bar{\alpha}_y = \sum C_{x_i} (\bar{y}_i - M_y)^2, \text{ где}$$

$\bar{\alpha}_y$ (с чертой) – групповая средняя; M_y – общая средняя; C_{x_i} – численности групп.

Например, если второму x соответствует 3 значения y (y_1, y_2, y_3), то групповая средняя определяется по формуле:

$$\bar{y} = \frac{y_1 + y_2 + y_3}{3}$$

Для проверки статистической достоверности корреляции двух признаков, а также для сравнения двух коэффициентов используют параметрический критерий. Коэффициент t_d достоверности корреляции вычисляется по формуле:

$$t_d = z \sqrt{n-3}, \text{ где}$$

t_d – коэффициент достоверности корреляции;

n – число объектов исследования;

z – выборочный коэффициент корреляции, значение которого определяют из r_{xy} по специальной таблице (см. приложение). Если вычисленное значение t_d больше критического значения критерия Стьюдента (см. приложение), то достоверность корреляции считается установленной на выбранном уровне значимости.

Достоверность различия коэффициентов определяется по формуле:

$$t_d = \frac{z_1 - z_2}{m_d}, \text{ где}$$

t_d – коэффициент достоверности различия коэффициентов корреляции;

z_1 и z_2 – значения параметра z , соответствующие первому и второму коэффициентам корреляции.

m_d – ошибка разности, которую вычисляют по формуле:

$$m_d = \sqrt{\frac{1}{n_1 - 3} + \frac{1}{n_2 - 3}}, \text{ где}$$

n_1 и n_2 – объемы первой и второй выборок.

Если вычисленное значение t_d больше критического (см. таблицу), то различие коэффициентов корреляции достоверно.

При наличии функциональной связи между параметрами имеет смысл определить ее характер, то есть характер **регрессии**. Наиболее простую картину статистической связи дает точечная диаграмма. Но одному и тому же значению первого признака может соответствовать несколько значений второго признака, поэтому следует принять за соответствующую значению первого признака среднюю арифметическую группы.

Числовые значения признака x и соответствующие им групповые средние второго признака можно изобразить в виде точек на координатной плоскости и все эти точки соединить прямыми. Полученная таким образом ломанная линия называется **эмпирической линией регрессии** (рис. 2).

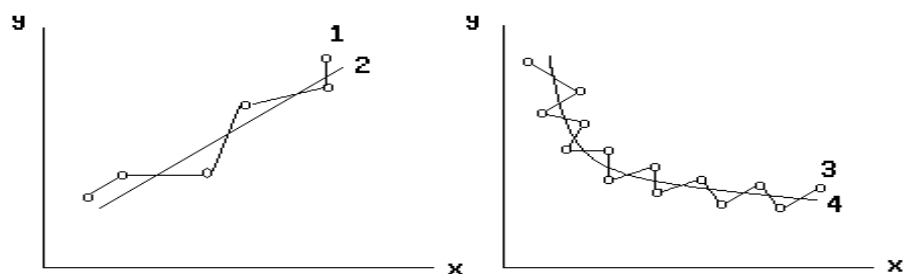


Рис. 2. Эмпирическая и теоретическая линии регрессии y по x
1, 3 – эмпирические, 2, 4 – теоретические

Статистическую связь желательно представить в виде некоторого точного соотношения или уравнения связи, которое называется **уравнением регрессии**. Соответствующая этому уравнению линия называется **теоретической линией регрессии**.

Задача приближенной замены статистической связи функциональной составляет содержание регрессивного анализа. Из всех линий, проходящих через совокупность точек на диаграмме, необходимо выбрать такую, вокруг которой точки группировались бы наиболее тесно.

Линия проводится таким образом, чтобы сумма квадратов отклонений от нее была минимальной. При этом первоначальный вид линии связи в известной мере произволен и определяется характером расположения точек на диаграмме.

Если связь по предположению линейная, то и соответствующее уравнение и линия регрессии будут иметь линейный характер. Уравнение регрессии следует искать в таком виде:

$$y = bx + C, \text{ где}$$

параметры b и C подбираются таким образом, чтобы сумма квадратов отклонения точек диаграммы от соответствующей прямой была бы минимальна.

Параметры определяются по формуле:

$$b = \frac{\tau}{\alpha_x}; \quad c = M_y - \frac{\tau}{\alpha_x} M_x, \text{ где}$$

τ – сумма произведений центральных отклонений коррелирующих пар вариант x по y ;

α_x – сумма квадратов центральных отклонений ряда по x ;

M_x – средняя арифметическая ряда по x ;

M_y – средняя арифметическая ряда по y .

Параметр b называется коэффициентом регрессии.

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Для расчета статистических параметров необходимо провести какой-либо элементарный эксперимент. Мы предлагаем определить частоту сердечных сокращений (ЧСС) и частоту дыхания (ЧД) до и после физической нагрузки. Для этого необходимо сделать следующее.

1. Создать группы обследуемых. В их роли, как правило, выступают члены студенческой группы. Группа обследуемых может содержать от 5 до 10 человек.
2. Определить у испытуемых в покое частоту сердечных сокращений и число дыхательных движений в минуту. Для этого следует вспомнить навыки, полученные на занятиях по нормальной физиологии. ЧСС определяет каждый испытуемый сам у себя. Частоту дыхания члены группы определяют друг у друга. Данные занести в таблицу, образец которой приведен в пособии (табл. 1).

3. Определить ЧСС и частоту дыхания после физической нагрузки. В качестве физической нагрузки следует использовать один из приведенных вариантов:
 - а) 10 приседаний за 30 секунд;
 - б) 20 приседаний за 1 минуту;
 - в) 40 приседаний за 1,5 минуты.
4. Рассчитать среднюю арифметическую, среднее квадратичное отклонение, ошибку средней арифметической, используя формулы, приведенные в «Теоретической части». Статистические параметры рассчитывать для значений, полученных до и после физической нагрузки.
5. Определить коэффициент Стьюдента для выявления отличий исследуемых физиологических показателей до и после физической нагрузки, используя формулы из «Теоретической части».
6. Рассчитать коэффициенты корреляции между ЧСС и ЧД в покое и после физической нагрузки, используя методы дисперсионного, корреляционного и регрессионного анализов, изложенные в настоящем пособии.
7. Составить протокол исследования в виде таблицы, отобразить результаты статистических расчетов в виде диаграммы или графика.
8. Сделать выводы о динамике отдельных характеристик сердечно-сосудистой и дыхательной систем при физической нагрузке, выявить связь между ними.

Таблица 1

Частота сердечных сокращений и частота дыхания
до и после физической нагрузки

№ п/п	ЧСС в покое	ЧСС после физической нагрузки	ЧД в покое	ЧД после физической нагрузки
1				
2				
3				
4				
5				
6				

Вопросы для самоконтроля

1. Каковы цели статистической обработки результатов медико-биологических исследований?
2. Каковы подходы для расчета основных статистических параметров?
3. Какова цель использования регрессионного анализа?

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

Выберите один правильный ответ.

1. ЧИСЛОВАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА, ОПИСЫВАЮЩАЯ СВОЙСТВА БОЛЬШИНСТВА ОБЪЕКТОВ НАБЛЮДЕНИЯ, – ЭТО
 - 1) стандартное отклонение
 - 2) среднее арифметическое
 - 3) ошибка средней
 - 4) дисперсия
2. МЕРОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ ВЫБОРОЧНОЙ СРЕДНЕЙ АРИФМЕТИЧЕСКОЙ ЯВЛЯЕТСЯ
 - 1) ошибка средней арифметической (m)
 - 2) среднеквадратическое отклонение (σ)
 - 3) дисперсия
 - 4) центральное отклонение от средней
3. ДОВЕРИТЕЛЬНЫМ ИНТЕРВАЛОМ НАЗЫВАЮТ
 - 1) вероятность допустить ошибку, определяемую формулой $p=(1-P)$
 - 2) центральное отклонение от средней
 - 3) область, в пределах которой с достаточной вероятностью находится характеристика генеральной совокупности
 - 4) дисперсию
4. КРИВАЯ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ИМЕЕТ ВИД
 - 1) симметричного колокола
 - 2) гиперболы
 - 3) параболы
 - 4) прямоугольника

5. КРИТЕРИЙ СТЬЮДЕНТА (t) ПРИМЕНЯЮТ
- 1) только при выполнении условия нормального распределения
 - 2) только при невыполнении условия нормального распределения
 - 3) при неизвестном законе распределения
 - 4) в любых условиях
6. ДЛЯ ОПИСАНИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ БИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ОБЫЧНО УРОВЕНЬ ЗНАЧИМОСТИ (p) ПРИНИМАЮТ РАВНЫМ
- 1) 1,0 и 5,0
 - 2) 0,05 % и 0,01 %
 - 3) 0,01 и 0,05
 - 4) 0
7. КОРРЕЛЯЦИОННАЯ ЛИНЕЙНАЯ ЗАВИСИМОСТЬ ОПИСЫВАЕТСЯ УРАВНЕНИЕМ
- 1) $y = ax^2 + bx + C$
 - 2) $y = \frac{b}{x} + C$
 - 3) $y = bx + C$
 - 4) $y = e^x + C$
8. ЗНАЧЕНИЯ КОЭФФИЦИЕНТА КОРРЕЛЯЦИИ НАХОДЯТСЯ В ПРЕДЕЛАХ
- 1) менее (-1)
 - 2) более (1)
 - 3) от (-1) до (1)
 - 4) от (0) до (1)
9. КОРРЕЛЯЦИОННОЕ ОТНОШЕНИЕ, БЛИЗКОЕ К ЕДИНИЦЕ, ОЗНАЧАЕТ
- 1) очень сильную функциональную связь
 - 2) очень слабую связь
 - 3) отсутствие связи
 - 4) ни чего не означает

10. СТАТИСТИЧЕСКАЯ ДОСТОВЕРНОСТЬ КОРРЕЛЯЦИИ ДВУХ ПРИЗНАКОВ СЧИТАЕТСЯ ДОКАЗАННОЙ, ЕСЛИ ВЫЧИСЛЕННОЕ ЗНАЧЕНИЕ

- 1) равно нулю
- 2) больше критического табличного значения
- 3) меньше критического табличного значения
- 4) равно критическому табличному значению

СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ

Задача 1

Имеется две группы параметров кровяного давления до и после эмоционального возбуждения человека, описываемые следующими статистическими характеристиками, представленными в виде $X \pm m$:

128,6±11,4 и 180,2±12,8 мм рт. ст.

Определить, достоверно ли различаются средние при уровне значимости 0,05 и 0,01.

Воспользоваться таблицей критических значений коэффициента Стьюдента, закон распределения считать нормальным, число измерений равным 10.

Задача 2

Были проведены исследования концентрации глюкозы в крови (ммоль/л) группы студентов. Значения оказались следующими:

5,3	5,2
5,3	6,1
4,7	5,5
3,9	5,6
6,3	5,8
5,1	4,3
4,9	

Найти среднее арифметическое и ошибку средней для полученных результатов исследования.

Задача 3

В эксперименте получено, что механическое напряжение сегментов аорты крысы до и после введения угарного газа составило:

До	После
8,9	7,2
7,4	5,1
9,2	8,1

10,4	7,4
5,8	5,7
6,9	2,8
9,4	3,1
8,8	5,4

Определить достоверно ли снижение тонуса гладких мышц аорты крысы при введении угарного газа

Считать, что данные подчиняются закону нормального распределения.

Тема 2

ОПРЕДЕЛЕНИЕ РАЗМЕРОВ БИОМАКРОМОЛЕКУЛ МЕТОДОМ МОНОСЛОЕВ

Цель занятия: Определить длину и площадь поперечного сечения молекулы олеиновой кислоты методом монослоев.

Материалы и оборудование: пластмассовая или эмалированная ванночка, обработанная парафином, тальк, мелкое сито для просеивания талька, микропипетки, раствор олеиновой кислоты, линейка, полоски парафинированной бумаги.

Вопросы для самоподготовки:

1. Устройство молекул липидов.
2. Взаимодействия липидов в моно- и бимолекулярных слоях.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Молекулы в зависимости от распределения их зарядов делятся на полярные и неполярные. Если центры положительных и отрицательных зарядов молекулы совпадают, то такие молекулы называются **неполярными**. Они плохо растворимы в воде, но хорошо – в неполярных растворителях.

Если центры положительных и отрицательных зарядов молекулы не совпадают, то такие молекулы называются **полярными**. Они хорошо растворимы в воде. В сложных молекулах органических веществ в роли полярных групп выступают гидроксильные, карбоксильные, аминогруппы и др.

Однако сложная органическая молекула одновременно содержит и полярные и неполярные группировки. Такие вещества называются **амфифильными**. К ним, в первую очередь, относятся липиды. Амфифильные вещества обладают поверхностно-активными свойствами и на поверхности воды образуют пленку.

Молекула липида состоит из гидрофильной головки и гидрофобного хвоста. Головку образует остаток фосфорной кислоты (фосфолипиды) или сахара (гликолипиды), а хвосты представлены двумя остатками жирных кислот. На разделе «вода – воздух» такие молеку-

лы образуют насыщенный адсорбционный слой. При этом головки липидов погружены в воду, а хвосты обращены в воздух.

Липиды, как правило, растекаются по поверхности водной фазы и образуют пленку. Толщина образовавшейся пленки при максимальной величине поверхностного натяжения соответствует длине молекулы. Поэтому такую пленку называют мономолекулярной или сокращенно – монослоем. Молекулы в насыщенных молекулярных слоях находятся близко друг от друга. В связи с этим монослой не поддается сдавливанию. Сопротивление сдавливанию, или поверхностное давление слоев, очень велико. Метод адсорбционных слоев широко используется в биологии при изучении строения клеточных мембран. Простейшей моделью клеточной мембраны является монослой липидов, образующийся на поверхности воды.

На поверхности воды мономолекулярная пленка липидов занимает определенную площадь (S). Если осторожно сжимать эту пленку, то ее площадь уменьшается. В состоянии максимального сжатия гидрофобные хвосты липидов выстраиваются строго параллельно. Подвижность хвостов сильно снижается, и липидный слой переходит в твердое состояние. Когда пленка слабо сжата, хвосты легко изгибаются в разных направлениях. Это состояние липидного монослоя моделирует жидкокристаллическое состояние мембраны.

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Парафинированную ванночку до половины заполняют дистиллированной водой. Вода должна быть без плавающих пылинок.

Две полоски бумаги, покрытые воском, кладут на поверхность воды на расстоянии 3–5 см друг от друга, сгибая их концы так, чтобы они плотно прилегали к краям ванночки и при необходимости свободно передвигались. Между полосками бумаги на поверхность воды равномерным слоем через сито насыпают тальк. Затем одну полоску бумаги, которая ближе к середине ванночки, осторожно забирают, стараясь не повредить слой талька.

Край талька служит границей мономолекулярной пленки исследуемого вещества и препятствием для ее проникновения в незаполненную часть ванночки.

Возле края ванночки на противоположной от талька стороне на поверхность воды с помощью микропипетки наносят небольшое ко-

личество раствора олеиновой кислоты. Ожидают, пока растворитель испарится. В результате на поверхности воды образуется мономолекулярная пленка.

После этого осторожно берут полоску бумаги двумя руками и двигают ее вдоль ванночки. Полоска бумаги сдвигает тальк и сдавливает мономолекулярную пленку. В определенный момент, если отпустить полоску бумаги, она начинает двигаться назад и занимает определенное положение в ванночке. Это означает, что сдавленный монослой толкает назад тальк с полоской бумаги, чтобы занять максимальную поверхность воды между полоской талька и свободным концом ванночки.

В этот момент измеряют размеры площади S , занимаемой монослоем, и рассчитывают S :

$$S = l \cdot d \quad (1), \text{ где}$$

l – длина монослоя, d – ширина монослоя.

Поскольку толщина монослоя δ соответствует длине молекулы, то можно записать:

$$\delta = \frac{V}{S} \quad (2), \text{ где}$$

V объем, который занимает монослой (фактически объем вылитого на поверхность воды вещества).

В связи с тем, что молекулы в монослое сближены на расстояние межмолекулярных взаимодействий и располагаются рядом, поперечное сечение молекулы q будет равно:

$$q = \frac{S}{n} \quad (3), \text{ где}$$

n – количество молекул в монослое.

Для определения n воспользуемся тем, что массу одной молекулы m_0 можно рассчитать, исходя из молекулярной массы данного вещества:

$$m_0 = \frac{M}{N} \quad (4), \text{ где}$$

M – молекулярная масса вещества, N – число Авогадро.

Тогда n можно определить по формуле:

$$n = \frac{m}{m_0} (5), \text{ где}$$

m – масса всего исследуемого вещества, из которого был получен монослой. Зная удельную плотность исследуемого вещества ρ и объем монослоя V , можно вычислить массу вещества:

$$m = V\rho (6)$$

Подставляя значения m и m_0 в формулу (5), получим:

$$n = \frac{V\rho N}{M} (7)$$

Затем это значение подставим в формулу (3) и получим окончательную формулу для расчета поперечного сечения молекулы:

$$q = \frac{SM}{V\rho N} (8)$$

Задание 1

Определить длину и площадь поперечного сечения молекулы олеиновой кислоты.

Провести последовательные измерения размеров монослоя, образованного при выливании на поверхность воды 0,05; 0,1 и 0,2 мл 0,001 % олеиновой кислоты. Для всех трех опытов рассчитать длину (δ нм) и площадь поперечного сечения (q нм²) по формулам (2) и (8).

Примечание. Для расчетов используйте следующие величины
 $M=282,27$; $N=6,02 \cdot 10^{23}$; $\rho=898$ кг/м³.

Задание 2

Определить среднеквадратичную ошибку полученных величин (Тема 1)

Вопросы для самоконтроля

1. Какие вещества называют амфифильными?
2. Каков принцип метода монослоев для определения размера макромолекул?

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

Выберите один или несколько правильных ответов.

1. ГОЛОВКИ МОЛЕКУЛ ЛИПИДОВ ЯВЛЯЮТСЯ
 - 1) гидрофобными
 - 2) гидрофильными
 - 3) амфифильными
 - 4) нерастворимыми в воде

2. ИНДУКЦИОННОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ОСУЩЕСТВЛЯЕТСЯ МЕЖДУ
 - 1) двумя недиполями
 - 2) двумя диполями
 - 3) диполем и недиполем
 - 4) несколькими диполями

3. ВОЗМОЖНОСТЬ ОБРАЗОВЫВАТЬ ЖИДКИЕ КРИСТАЛЛЫ ОПРЕДЕЛЯЕТСЯ СВОЙСТВОМ ЛИПИДОВ
 - 1) амфифильность
 - 2) гидрофобность
 - 3) гидрофильность
 - 4) растворимость в органических растворителях

4. ТИПЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ МЕЖДУ ЛИПИДАМИ В БИСЛОЕ
 - 1) ковалентные связи
 - 2) дисперсионное взаимодействие
 - 3) гидрофобные взаимодействия
 - 4) электростатические силы

5. ЛИПИДЫ РАСПОЛАГАЮТСЯ В МЕМБРАНЕ В ВИДЕ БИСЛОЯ. ЭТОТ ФЕНОМЕН ВПЕРВЫЕ УСТАНОВЛЕН
 - 1) Р. Гуком
 - 2) Даниэлли и Давсоном
 - 3) Гортером и Гренделем
 - 4) Сингером и Николсом

6. НАХОДЯСЬ В ЖИДКОКРИСТАЛЛИЧЕСКОМ СОСТОЯНИИ, ЛИПИДЫ СПОСОБНЫ К
- 1) латеральной диффузии
 - 2) вращательным движениям
 - 3) трансмембранному переходу
 - 4) образованию кинков
7. ХВОСТЫ ЛИПИДОВ ВКЛЮЧАЮТ В СЕБЯ ОСТАТКИ
- 1) двух насыщенных жирных кислот
 - 2) фосфорной кислоты
 - 3) двух ненасыщенных жирных кислот
 - 4) насыщенной и ненасыщенной жирных кислот
8. ГОЛОВКИ ЛИПИДОВ
- 1) незаряжены, но полярны
 - 2) несут отрицательный заряд
 - 3) несут положительный заряд
 - 4) гидрофобны
 - 5) гидрофильны
9. ХОЛЕСТЕРИН В МЕМБРАНЕ
- 1) регулирует упаковку липидов в бислое
 - 2) увеличивает жесткость мембраны
 - 3) снижает микровязкость мембраны
 - 4) увеличивает микровязкость бислоя
10. СФИНГОМИЕЛИН ОТНОСИТСЯ К
- 1) гликолипидам
 - 2) глицерофосфолипидам
 - 3) стероидам
 - 4) сфингофосфолипидам

СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ

Задача 1

Известно, что длина молекулы индивидуальных липидов, из которых созданы липосомы, составляет 2,6 нм. Измерения показали, что толщина стенки липосомы составила 4,2 нм. Объясните расхождение результатов расчетов и измерений.

Задача 2

Объясните, какое из приведенных ниже соединений имеет наименьшую проницаемость через липидный бислой и почему.

Вещества: толуол, этанол, ионы кальция, ионы калия.

Задача 3

Исследовалась проницаемость бислойной липидной мембраны для метиленового синего при двух температурах 20°C и 30°C . Коэффициенты проницаемости оказались различными. Объясните, чем обусловлено различие коэффициентов проницаемости в этих условиях. При какой температуре коэффициент проницаемости оказался выше и почему?

Тема 3

ОСМОТИЧЕСКОЕ ДАВЛЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЕЙ

3.1. Определение осмотического давления биологических жидкостей косвенным методом

Цель занятия: Определить концентрацию неизвестного раствора по методу Барджера-Раста и рассчитать его осмотическое давление.

Материалы и оборудование: Набор контрольных растворов NaCl, (0, 5 %, 0, 6 %, 0, 7 %, 0, 8 %, 0, 9 %, 1 %).

Микроскоп МБС-1 или МБС-2. Набор капилляров, мастика или пластилин.

Вопросы для самоподготовки:

1. Осмотическое давление биологических жидкостей (плазмы крови и др.)
2. Факторы, определяющие осмотическое давление.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Известно, что ионный состав и осмотическое давление внутриклеточной и внеклеточной жидкостей различны. Поддержание этого различия является жизненно необходимым для организма и осуществляется благодаря функционированию клеточных мембран. В простейшем представлении клеточная мембрана образована двойным слоем липидов, содержащим некоторое количество белков. Мембрана полупроницаема и через нее свободно проходит вода. Мембрана достаточно эластична, но слишком большим силам, действующим на разрыв, она противостоять не может. Если слой растворителя отделить полупроницаемой мембраной от раствора какого-либо вещества (не проникающего через эту мембрану), то будет проходить односторонняя диффузия растворителя в раствор. Это явление получило название *осмоса*. Диффузия растворителя через полупроницаемую мембрану будет проходить до тех пор, пока не уравниваются силы с обеих сторон мембраны. Растворитель всегда будет проходить из раствора с меньшей концентрацией в раствор с большей концентрацией. Переход растворителя осуществляется за счет диффузных

сил. В процессе осмоса происходит увеличение объема раствора за счет входа части растворителя (рис. 3).

Осмотическим давлением называется давление на полупроницаемую мембрану, создаваемое растворителем, перешедшим в раствор с большей концентрацией. Осмотическое давление обнаруживает себя только там, где выполняются три условия:

- наличие полупроницаемой мембраны;
- разность концентраций;
- переход растворителя.

Осмотическое давление (P) – это такое давление любого раствора, которым обладало бы растворенное вещество, если бы, находясь в газообразной фазе, оно занимало тот же объем, что занимает раствор.

Таким образом, к разбавленным растворам применимо уравнение идеального газа:

$$P = iRTc, \text{ где}$$

c – концентрация (моль/литр);

T – абсолютная температура;

$R=0,082$ литр/град·моль – универсальная газовая постоянная;

i – коэффициент Вант-Гоффа для растворов электролитов (для NaCl $i=2$, для CaCl_2 $i=3$).

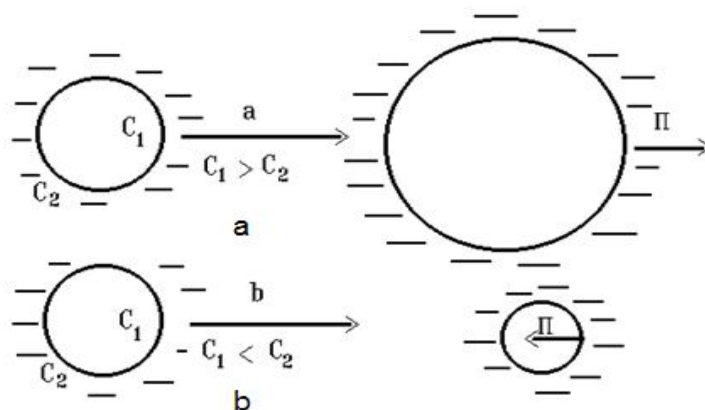


Рис.3. Взаимодействие воды с частицами геля при набухании.

В живых системах вода является растворителем органических и минеральных веществ. Если клетку поместить в раствор с концентрацией растворенных веществ меньшей, чем концентрация веществ внутри клетки (гипотоническая среда), то вода будет поступать в клетку до тех пор, пока не установится равенство осмотических ак-

тивностей раствора снаружи – внутри. При этом объем клетки увеличивается (рис. 3а).

Если это увеличение выше предела, определенного прочностью (эластичностью) плазматической мембраны, то она разрывается.

Если клетку поместить в раствор с концентрацией растворенных веществ большей, чем концентрация внутри клетки, то вода будет выходить из клетки до тех пор, пока не сравняются концентрации. При этом объем клетки уменьшается (рис. 3б).

Существует много методов измерения осмотического давления. В настоящей работе рассматривается косвенный метод определения осмотического давления биологических жидкостей, основанный на понижении упругости пара раствора по отношению к чистому растворителю – метод Барджера-Раста. Этот метод позволяет производить измерения при обычной температуре, не нарушая свойств живой системы.

При работе по этому методу осмотическое давление исследуемого раствора сравнивается с известным давлением контрольных растворов. Этим методом можно улавливать различия концентраций, соответствующих 0,1 %.

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

1. С помощью пипетки заполнить капилляр исследуемым раствором примерно до половины. Затем, слегка наклонив капилляр, добиться попадания в него пузырька воздуха. После этого с помощью пипетки ввести в капилляр раствор известной концентрации. Жидкость должна достигать концов капилляра (по краям капилляра не должно быть пузырьков). Пузырек воздуха должен находиться приблизительно на середине капилляра.

2. Капилляр быстро и тщательно замазывают с обеих сторон замазкой или пластилином. Для того чтобы замазка плотно пристала к наружным стенкам капилляра, они должны быть совершенно сухими, поэтому его необходимо обтирать ватой или фильтровальной бумагой.

3. **Следует помнить**, что большинство ошибок при работе по методу Барджера-Раста происходит из-за плохой запайки капилляра, поэтому к данной части работы следует относиться особенно внимательно!

4. Капилляр кладут на предметное стекло, прикрепляя каплей замазки. Стекло с капилляром помещают на предметный столик микроскопа, снабженного окуляр-микрометром, и наводят фокус на один из менисков жидкости или на оба, если пузырек полностью помещается в поле зрения. Далее наблюдают за движением мениска жидкости.

5. На поверхности жидкости, имеющей меньшее осмотическое давление (т. е. большую упругость пара), вода испаряется, и пар одновременно осаждается на жидкости, имеющей большее осмотическое давление (меньшую упругость пара), поэтому объем первой капли уменьшается, а второй увеличивается.

Мениск всегда движется в сторону раствора с меньшей концентрацией!

6. Определив, в каком направлении движется мениск, решают, какой из растворов имеет большую концентрацию.

7. Исследуемый раствор последовательно сравнивают с контрольным и находят такой контрольный раствор, при котором обе капли остаются неизменными по объему (мениск не движется). В этом случае его осмотическая концентрация равна осмотической концентрации исследуемого раствора. Для удобства работы во всех пробах следует наблюдать мениск исследуемого (или контрольного) раствора и помещать данный раствор на предметный столик микроскопа всегда с одной и той же стороны.

Результаты занести в таблицу 2.

Таблица 2

Направление движения мениска в растворах с разной концентрацией*

Контрольный раствор	Направление движения мениска	Исследуемый раствор
0,1 % NaCl		X
0,2 % NaCl		X
0,3 % NaCl		X
0,4 % NaCl		X
0,5 % NaCl		X
0,6 % NaCl		X
0,7 % NaCl		X
0,8 % NaCl		X
0,9 % NaCl		X
1 % NaCl		X

Примечание. Во второй колонке стрелкой показать, к какому раствору (с известной или неизвестной концентрацией движется мениск).

8. Растворы в течение всего опыта следует держать в закрытых сосудах во избежание испарения воды и изменения концентрации растворов.

9. Прежде чем приступить к определению концентрации неизвестного раствора, необходимо хорошо освоиться с методикой, для чего надо сделать ряд проб с растворами известной концентрации и дистиллированной водой. Убедившись, что направление движения мениска во всех пробах соответствует ожидаемому, можно переходить к выполнению лабораторной работы.

10. Установив концентрацию исследуемого раствора, вычисляют его осмотическое давление. При этом необходимо предварительно перевести процентную концентрацию раствора в молярную.

11. Молярная концентрация раствора (молярность) – это количество молей вещества, содержащихся в одном литре раствора.

Пример расчета осмотического давления исследуемого раствора.

Исследуемый раствор имеет осмотическую концентрацию, соответствующую 0,7 %-ному раствору NaCl. Температура во время измерений составляла 37 °С.

Одномолярный раствор хлорида натрия содержит 58,5 г NaCl в одном литре воды. Следовательно, 0,7 %-ный раствор NaCl соответствует:

$$7:58,5=0,12 \text{ моль/литр.}$$

Подставляя вычисленное значение молярной концентрации в формулу для вычисления осмотического давления P и помня, что каждая молекула NaCl образует два иона, находим:

$$P=2 \cdot 0,12 \cdot 0,082 \cdot (273+37)=6,1 \text{ атм.}$$

Вопросы для самоконтроля

1. В чем состоит принцип косвенного метода для определения осмотического давления?
2. Каково различие между гипо- и гиперосмотическими растворами?

3.2. Осмотические явления в биообъектах

Цель занятия: Определить концентрацию раствора сахарозы, являющейся изотонической по отношению к растительной ткани.

Материалы и оборудование: 1 М раствор сахарозы, дистиллированная вода, пробирки, мерные пипетки, фильтровальная бумага, кусочки растительной ткани.

Вопросы для самоподготовки:

1. Осмос и его значение в жизнедеятельности клетки и организма в целом.
2. Факторы, определяющие осмотическое давление внутри- и внеклеточной жидкостей.

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

1. Из исходного раствора сахарозы (1 моль/л) приготовить растворы следующих концентраций (моль/л): 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8 и 0,9.

2. Приготовить примерно одинаковые навески клубня картофеля и взвесить их с помощью торсионных весов.

3. Поместить кусочки картофеля в пробирки с разными концентрациями сахарозы.

4. Через 30–40 минут кусочки вытащить, аккуратно обсушить фильтровальной бумагой и вновь взвесить.

5. Результаты занести в таблицу 3.

Таблица 3

Концентрация раствора сахарозы, моль/л	Вес навески до опыта, мг	Вес навески после опыта, мг	Характер раствора по отношению к клеткам ткани
0,1			
0,2			
0,3			
0,4			
0,5			
0,6			
0,7			
0,8			
0,9			
1,0			

6. Согласно результатам, отраженным в таблице, определить какие растворы сахарозы являются гипотоническими, изотоническими и гипертоническими по отношению к клеткам растительной ткани.

7. Рассчитать осмотическое давление изотонического раствора.

8. На основании полученных данных построить гистограмму, показывающую изменение веса кусочков растительной ткани в растворах сахарозы разной концентрации. При построении гистограммы за 100 % принять вес навесок до погружения в растворы сахарозы.

Вопросы для самоконтроля

1. Каков принцип определения изотонического раствора по отношению к растительной ткани в настоящей работе?
2. Каково значение осмоса в жизнедеятельности растительного и животного организмов?

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

Выберите один или несколько правильных ответов.

1. ОСМОС ПРЕДСТАВЛЯЕТ СОБОЙ ПРИМЕР ПАССИВНОГО ТРАНСПОРТА
 - 1) воды
 - 2) ионов натрия
 - 3) ионов хлора
 - 4) любых соединений
2. ПАССИВНЫЙ ТРАНСПОРТ ХАРАКТЕРИЗУЕТСЯ
 - 1) движением переносимого вещества по градиенту его концентрации
 - 2) наличием дополнительного источника энергии
 - 3) движением переносимого вещества против градиента его концентрации
 - 4) увеличением градиента переносимого вещества
 - 5) уменьшением градиента переносимого вещества
3. КЛЕТКИ ПРИ ИХ ПОМЕЩЕНИИ В ИЗОТОНИЧЕСКИЕ РАСТВОРЫ
 - 1) сжимаются
 - 2) набухают
 - 3) не изменяют свой объем

- 4) изменяют свой объем и форму
4. ЗНАЧЕНИЕ ОСМОСА В ЖИВОМ ОРГАНИЗМЕ
 - 1) обмен жидкостью между тканями и кровью
 - 2) газообмен в легких
 - 3) газообмен в тканях
 - 4) всасывание продуктов переваривания в тонком кишечнике
5. ОСМОТИЧЕСКИ АКТИВНЫМИ В ПЛАЗМЕ КРОВИ ЯВЛЯЮТСЯ
 - 1) белки
 - 2) ионы натрия, калия
 - 3) холестерин
 - 4) глюкоза
6. УСЛОВИЯ, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ РАЗВИТИЯ ОСМОТИЧЕСКИХ ЯВЛЕНИЙ, ЭТО –
 - 1) полупроницаемая мембрана
 - 2) разность концентраций осмотически активного вещества
 - 3) трансмембранный переход растворителя
 - 4) трансмембранный переход растворенного вещества
7. ГИПЕРТОНИЧЕСКАЯ СРЕДА ХАРАКТЕРИЗУЕТСЯ ТЕМ, ЧТО КОНЦЕНТРАЦИЯ РАСТВОРЕННЫХ ВЕЩЕСТВ
 - 1) выше, чем в клетке
 - 2) ниже, чем в клетке
 - 3) равна внутриклеточной
 - 4) отличается от внутриклеточной
8. ОСМОТИЧЕСКОЕ ДАВЛЕНИЕ ПЛАЗМЫ КРОВИ
 - 1) остается неизменным
 - 2) изменяется только при патологических процессах в организме
 - 3) увеличивается при каждом приеме пищи
 - 4) увеличивается при недостатке воды
 - 5) уменьшается при сахарном диабете
9. ХОЛЕСТЕРИН МЕМБРАН
 - 1) регулирует упаковку липидов в бислое
 - 2) увеличивает жесткость мембраны

- 3) снижает микровязкость мембраны
- 4) увеличивает микровязкость бислоя

10. ОНКОТИЧЕСКОЕ ДАВЛЕНИЕ – ЭТО ОСМОТИЧЕСКОЕ ДАВЛЕНИЕ

- 1) углеводов
- 2) солей
- 3) белков
- 4) любых органических соединений

СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ

Задача 1

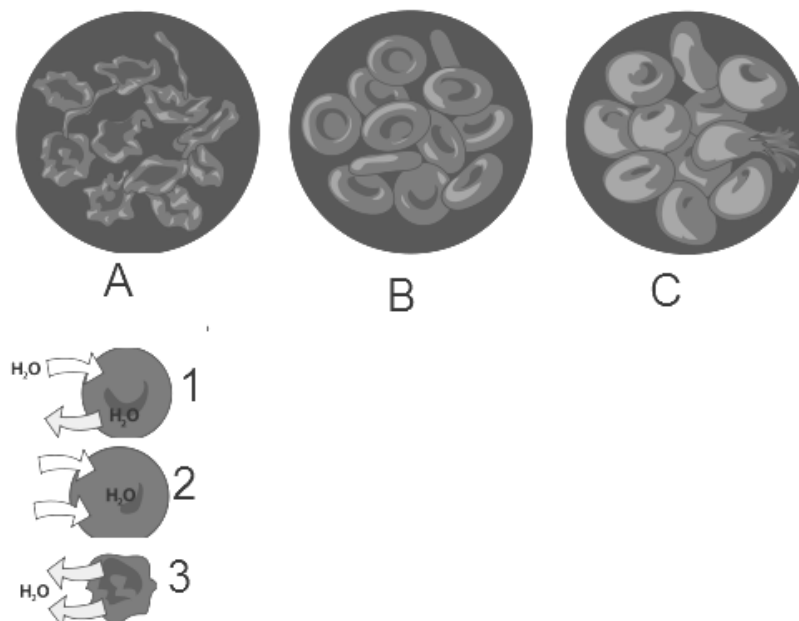
Одно из важнейших веществ, от концентрации которого зависит осмотическое давление, – это глюкоза. Как будет изменяться осмотическое давление плазмы крови, если концентрация глюкозы в крови превысит допустимый уровень? Какие последствия для клеток крови это вызовет?

Задача 2

Объясните процессы, которые происходят с эритроцитами при помещении их в гипо- и гипертонические среды. От чего зависит резистентность красных клеток крови по отношению к растворам с разным осмотическим давлением?

Задача 3

Внимательно рассмотрите рисунок. Определите, какой рисунок соответствует гипо-, изо- и гипертонической средам, в которую помещали клетки. Соотнесите с этим процессы, которые изображены под цифрами 1, 2 и 3.



Тема 4

ИССЛЕДОВАНИЕ НАБУХАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ТКАНЕЙ ВЕСОВЫМ МЕТОДОМ

Цель занятия: *Определение степени набухания ткани в зависимости от pH растворов.*

Материалы и оборудование: весы торсионные, фильтровальная бумага, чашки Петри, мерные цилиндры на 10-25 мл, секундомер.

Вопросы для самоподготовки

1. Механизм набухания биополимеров в клетках.
2. Параметры, описывающие процесс набухания.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Набуханием называется поглощение жидкости гелем, сопровождающееся увеличением его объема и массы. Различные виды гелей обладают способностью избирательно набухать в определенном для каждого из них растворителе.

Начальная стадия набухания сопряжена с образованием сольватной оболочки вокруг активных групп, находящихся на поверхности коллоидных частиц. Образование такого молекулярного слоя растворителя вокруг коллоидной частицы сопровождается заметным выделением тепла. Напротив, последняя стадия набухания связана с проникновением воды в межмицеллярные пространства и, в известных случаях, с частичным растворением. Вторая стадия набухания заметным тепловым эффектом не сопровождается.

Исследование динамики набухания показывает, что в ранней стадии происходит уменьшение объема набухающего геля – сжатие, или стрикция. Вместо термина «стрикция» иногда употребляют термин «контракция». При исследовании набухания геля необходимо четко разграничить два понятия: степень набухания и скорость набухания. **Степень набухания** определяется предельным количеством жидкости, которая поглощается единицей веса или объема ткани. Степень набухания зависит от сольватации мицелл, от эластичности геля, его прозрачности и способности к последующему растворению, а также от температуры. **Скорость набухания** определяется количеством жидкости, поглощенной при набухании за единицу времени.

Она зависит, прежде всего, от внутреннего трения поглощенной гелем жидкости и практически очень мало зависит от температуры. Исследования кинетики набухания указывают на то, что этот процесс протекает по закону мономолекулярной реакции.

В жизнедеятельности организма набухание биокolloидов играет немаловажную роль и служит одним из факторов, регулирующих водный баланс клеток и тканей. Степень набухания тканей зависит от их функционального состояния, но особенно резко меняется при патологических процессах (ожог, воспаление, злокачественные новообразования). Значительное влияние на процесс набухания оказывают солевой состав среды, концентрация водородных ионов, коллоидно-осмотическое действие многих физико-химических факторов.

Степень набухания гелей и биологических тканей измеряется различными методами, основанными на измерении длины, объема и веса набухающего геля и ткани. В биологических исследованиях наибольшее распространение имеют весовые методы.

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

1. Приготовить кусочки ткани для взвешивания. Это могут быть кусочки растительной или животной ткани. Удобно для данной работы использовать крупные семена какого-либо растения (горох, чечевица и др). Навески должны быть из цельных кусочков ткани без излишних порезов, так как последние изменяют поверхность набухающей ткани, что может привести к искажению результатов исследования. Масса навесок не должна превышать 200 мг.

2. На торсионных весах произвести взвешивание подготовленных кусочков ткани. Взвешенные кусочки ткани помещают в чашки Петри. Дно чашки Петри должно быть разделено на секторы. В каждый сектор помещают навеску. Данные взвешивания занести в таблицу. После этого в чашку Петри наливают жидкость, в которой должна набухать ткань. Жидкости наливать столько, чтобы кусочки ткани погрузились в нее целиком.

3. Через 5 минут навески, подсушенные фильтровальной бумагой, вновь взвесить на торсионных весах. Данные занести в таблицу. Затем ткань снова погрузить в раствор.

4. Через 5 минут снова провести взвешивание и так повторять до тех пор, пока вес кусочков ткани не перестанет изменяться. Вес ткани

считают не изменяющимся тогда, когда два следующие друг за другом взвешивания дают одинаковый результат.

5. Определить степень набухания навесок через 5, 10, 15 и т. д. минуи. Согласно приведенной ниже формуле k – степень набухания в определенный момент времени:

$$k = \frac{m_1 - m_0}{m_0} \times 100 \%, \text{ где}$$

m_0 начальный вес навески, m_1 – вес навески через 5 (10, 15 и т. д.).

Следует ПОМНИТЬ, что степень набухания рассчитывается для каждой навески в каждый момент времени.

Задание 1

Исследовать набухание биологической ткани.

1. Исследовать процесс набухания растительной ткани (семена гороха или чечевицы, клубень картофеля и др.) в физиологическом растворе. Опыт провести описанным выше порядком.
2. Занести результаты в таблицу.
3. Результаты набухания тканей в физиологическом растворе представить в виде графика. По оси абсцисс откладывается время (в минутах), а по оси ординат – средние значения степени набухания (в %).
4. Провести математическую обработку полученных результатов: рассчитать средние арифметические степени набухания для каждой точки времен, определить ошибку средней арифметической.

Примечание. Основные формулы статистической обработки даны в методической разработке «Методы статистической обработки результатов биофизического эксперимента».

Задание 2

Исследовать влияние кислоты и щелочи на набухание биологической ткани.

1. Исследование проводится с навесками растительной ткани, которые помещают в физиологический раствор с добавлением соляной кислоты (0,4 мл. 0, 1н HCl на 5 мл физиологического раствора) или с добавлением едкого натра (0,4 мл. 0,1 н NaOH на 5 мл физиологического раствора).
2. Результаты исследования представить в виде графика, по оси абсцисс откладывается время в минутах, по оси ординат – степень набухания.

3. Провести математическую обработку результатов, оценить различия степени набухания в различных растворах.

Таблица 4

N	Контроль	5 минут				10 минут			
	мг	мг	k %	$x_i - x_{cp}$	$(x_i - x_{cp})^2$	мг	k %	$x_i - x_{cp}$	$(x_i - x_{cp})^2$
1									
2									
3									
4									
5									
$x_{cp} \Sigma$ $(x_i - x_{cp})^2$									

При необходимости добавить следующие столбцы (15, 20, 25 минут).

Вопросы для самоконтроля

1. Что называется процессом набухания? Каков его механизм?
2. От каких факторов зависит степень набухания?

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

Выберите один или несколько правильных ответов.

1. ГЕЛЬ ПРЕДСТАВЛЯЕТ СОБОЙ
 - 1) истинный раствор
 - 2) суспензию
 - 3) коллоидный раствор
 - 4) эмульсию
2. СТРИКЦИЯ – ЭТО
 - 1) сжатие
 - 2) набухание
 - 3) контракция
 - 4) увеличение объема
3. НАБУХАНИЕ ГЕЛЯ СОПРОВОЖДАЕТСЯ
 - 1) снижением объема
 - 2) изменением формы клетки
 - 3) увеличением объема
 - 4) увеличением массы объекта

4. ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА ПРОЦЕСС НАБУХАНИЯ
 - 1) рН среды
 - 2) температура
 - 3) действие кислот или щелочей
 - 4) состав среды

5. НАБУХАНИЮ ПОДВЕРЖЕНЫ
 - 1) белки
 - 2) неорганические соединения
 - 3) клетки
 - 4) полисахариды

6. СТЕПЕНЬ НАБУХАНИЯ – ЭТО ПРЕДЕЛЬНОЕ КОЛИЧЕСТВО ЖИДКОСТИ, КОТОРОЕ ПОГЛОЩАЕТСЯ
 - 1) единицей веса ткани
 - 2) за одну минуту
 - 3) единицей объема ткани
 - 4) за любой временной промежуток

7. СКОРОСТЬ НАБУХАНИЯ ЗАВИСИТ ОТ
 - 1) температуры
 - 2) внутреннего трения поглощенной гелем жидкости
 - 3) кислотности среды
 - 4) атмосферного давления

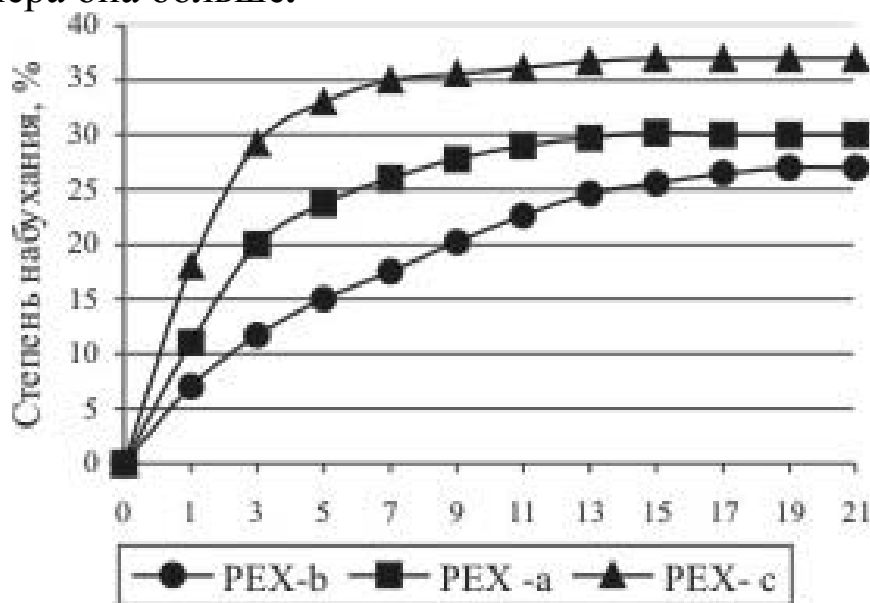
8. СКОРОСТЬ НАБУХАНИЯ – ЭТО ПРЕДЕЛЬНОЕ КОЛИЧЕСТВО ЖИДКОСТИ, КОТОРОЕ ПОГЛОЩАЕТСЯ
 - 1) единицей веса ткани
 - 2) за одну минуту
 - 3) единицей объема ткани
 - 4) за любой временной промежуток

9. ИССЛЕДОВАНИЕ КИНЕТИКИ НАБУХАНИЯ ПОКАЗАЛО, ЧТО ЭТОТ ПРОЦЕСС ПРОТЕКАЕТ ПО ТИПУ
 - 1) мономолекулярной реакции
 - 2) бимолекулярной реакции
 - 3) тримолекулярной реакции
 - 4) реакции нулевого порядка

СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ

Задача 1

На рисунке приведены графики степени набухания трех полимеров. Графически оцените скорость набухания и определите, для какого полимера она больше.



Задача 2

Гели, восприимчивые к pH, можно использовать для направленной доставки лекарства. Чтобы ввести его в гелевый носитель, достаточно поместить образец геля в раствор лекарственного вещества (в том числе и такого крупного, как белок), и оно окажется внутри полимерной матрицы. Затем гель высушивают (удаляют растворитель), и тогда он становится лекарственной формой. Если этот «контейнер» снова поместить в растворитель, лекарственное вещество будет выделяться, причем тем быстрее, чем больше степень набухания геля (т. е. чем сильнее раскрыты его поры). Так полимерная матрица контролирует скорость выделения лекарства. Но, кроме того, она может обеспечить его доставку непосредственно к тому участку организма, который нуждается в препарате

Известно, что разные отделы пищеварительного тракта человека сильно различаются кислотностью. Чувствительный к pH гель с лекарством, попав в организм, отдаст содержимое там, где он набухнет.

Используя приведенный рисунок, определите, какими свойствами должны обладать гели, чтобы набухать в желудке, а какими, чтобы набухать в кишечнике.

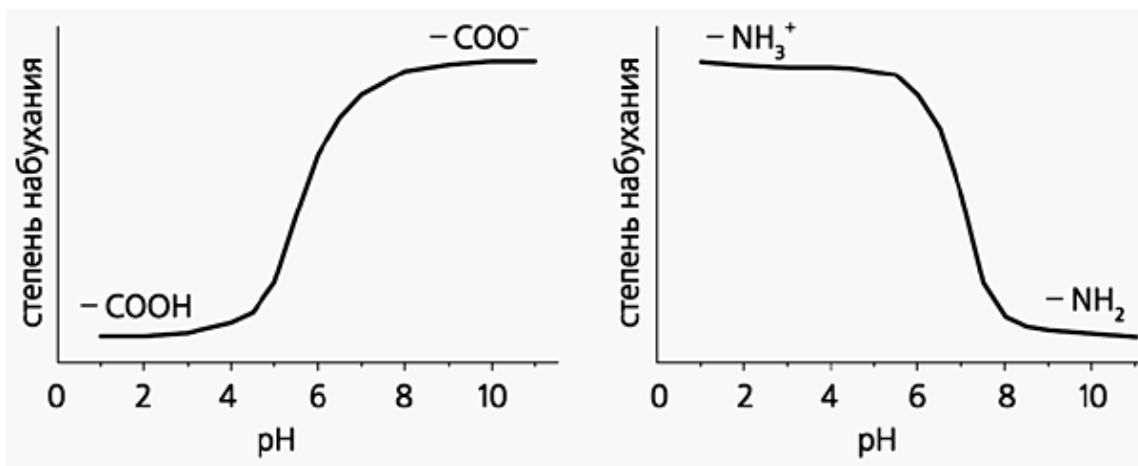


Рис. Влияние pH на набухание геля с группами слабой кислоты (слева и с группами слабого основания). Если полимерные цепи не имеют ионизованных групп, гель находится в скollapsed состоянии; заряженный гель набухает.

Тема 5

МЕТОД ФОТОЭЛЕКТРОКОЛОРИМЕТРИИ

5.1. Определение концентрации окрашенных растворов

Цель занятия: Освоить принципы работы на фотоэлектроколориметре, определить концентрацию неизвестного раствора.

Материалы и оборудование: фотоэлектроколориметр, набор кювет, раствор метиленового синего, дистиллированная вода, пробирки, мерные пипетки, фингер.

Вопросы для самоподготовки

1. Механизм поглощения света веществом.
2. Практическое применение метода фотоэлектроколориметрии.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Теоретической основой метода является закон Ламберта–Бера, устанавливающий зависимость между интенсивностью света, проходящего через раствор вещества, поглощающего свет, и концентрацией этого раствора:

$$I = I_0 \cdot e^{-\varepsilon \cdot c \cdot l}, \text{ где}$$

ей этого раствора:

I – интенсивность света, вышедшего из раствора;

I_0 – интенсивность падающего света;

ε – молярный коэффициент поглощения, который характеризует поглощающую способность данного вещества;

c – концентрация раствора;

l – длина оптического пути.

Таким образом, закон Ламберта–Бера устанавливает, что интенсивность падающего света экспоненциально уменьшается в зависимости от концентрации раствора и длины оптического пути.

На практике закон Ламберта–Бера часто используют в логарифмической форме. Для этого вводится понятие оптической плотности раствора. Оптическая плотность (D) представляет собой десятичный логарифм отношения начальной интенсивности к интенсивности света, вышедшего из образца:

$$D = \lg \frac{I_0}{I}$$

В логарифмической форме закон Ламберта–Бера устанавливает линейную зависимость между концентрацией раствора (c) и оптической плотностью (D) при постоянной длине оптического пути:

$$D = \varepsilon cl$$

Здесь обозначения те же, что и приведенные выше.

Следует помнить, что закон Ламберта–Бера выполняется при нескольких условиях:

1. Свет должен быть монохроматическим, т. е. иметь определенную длину волны.
2. Частицы вещества должны хаотически распределяться в толще раствора.
3. Частицы растворенного вещества не должны взаимодействовать друг с другом.

Последние два условия выполняются, если раствор разбавлен (используются низкие концентрации вещества). При нарушении любого из условий закон не выполняется.

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Для построения зависимости оптической плотности от концентрации раствора необходимо с помощью фотоэлектроколориметра измерить этот параметр для растворов определенной концентрации. Поэтому необходимо приготовить эти растворы, которые называются калибровочными. Это делают методом последовательных разведений.

Сначала готовят раствор исходной концентрации, например, 0,5 % раствор. Для этого 0,05 г метиленового синего разводят в 10 мл воды. Затем из исходного раствора готовят растворы следующих концентраций: 0,05; 0,01; 0,005; 0,004; 0,003; 0,002 и 0,001 %.

В зависимости от исходного вещества могут использоваться другие концентрации калибровочных растворов.

Следующим шагом является выбор светофильтра, на котором будут проводиться измерения. Для этого необходимо измерить оптическую плотность раствора метиленового синего с концентрацией 0,005 % на всех имеющихся в приборе светофильтрах (красный, желтый, зеленый, голубой, синий, фиолетовый).

После этого строится график зависимости оптической плотности от длины волны света, задаваемой светофильтром прибора (см. инструкцию к прибору).

Полученный график отражает поглощение света исследуемым веществом и называется *спектром поглощения*.

Выбирается тот светофильтр, с использованием которого получается максимальное значение оптической плотности. В нашем случае это красный светофильтр.

Затем строится калибровочный график.

Для этого необходимо следующее:

1. Прибор прогреть 25–30 минут.
2. Открыв крышку, установить в каретку против луча кювету с раствором с наименьшей концентрацией, рядом – кювету с водой.
3. Оба барабана прибора установить на «0».
4. Закрыть крышку и, открыв шторку ФЭКа, вывести стрелку потенциометра на «0» левым барабаном.
5. Закрыть шторку и поместить в луч кювету с водой, повернув ручку каретки до упора.
6. Открыть шторку, вывести стрелку потенциометра на «0» барабаном, расположенным на лицевой панели прибора.
7. Отсчитать значение экстинкции (оптической плотности) по красной шкале барабана, расположенного на лицевой панели прибора.
8. Повторить измерения для всех растворов.
9. Построить зависимость оптической плотности от концентрации раствора.

Калибровочный график используется для определения концентрации неизвестного раствора.

Для этого следует выполнить следующие процедуры:

- Хорошо промыть кювету водой и спиртом.
- Заполнить ее исследуемым раствором и определить экстинкцию (оптическую плотность), как описано выше.

Задание 1

Приготовить растворы метиленового синего заданных концентраций.

Выбрать светофильтр для работы с растворами метиленового синего.

Задание 2

Определить с помощью калибровочного графика концентрацию неизвестного раствора.

Вопросы для самоконтроля

1. На каких принципах основан закон поглощения света веществом?
2. При каких условиях выполнения закона Ламберта–Бера?

5.2. Определение молярного коэффициента поглощения окрашенных растворов

Цель занятия: определить фотоэлектроколориметрическим методом молярные коэффициенты поглощения предложенных веществ

Приборы и оборудование: ФЭК, набор пробирок в штативе и мерных пипеток, 10 % растворы CuSO_4 и NiCl_2 .

Вопросы для самоподготовки

1. Понятия оптической плотности и молярного коэффициента поглощения.
2. Условия выполнения закона Ламберта–Бера.

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

1. Приготовить калибровочные растворы CuSO_4 и NiCl_2 согласно приведенной ниже прописи (табл. 5).

Таблица 5

№ р-ра	Концентрация приготавливаемого раствора, %	Кол-во исходного раствора, мл	Кол-во воды, мл
1	8 %	8 мл	2 мл
2	6 %	6 мл	4 мл
3	4 %	4 мл	6 мл
4	2 %	2 мл	8 мл
5	1 %	1 мл	9 мл

В зависимости от исходного вещества могут использоваться другие концентрации калибровочных растворов.

2. Выбрать светофильтр, на котором будут проводиться измерения. Для этого необходимо измерить оптическую плотность исследуемых растворов с концентрацией 6 % на всех имеющихся в приборе светофильтрах (красный, желтый, зеленый, голубой, синий, фиолетовый).

После этого строится график зависимости оптической плотности от длины света, задаваемой светофильтром прибора (см. инструкцию к прибору).

Полученный график отражает поглощение света исследуемым веществом и называется *спектром поглощения*.

Выбирается тот светофильтр, с использованием которого получается максимальное значение оптической плотности. В нашем случае это *красный светофильтр*.

3. Построить калибровочные графики для каждого вещества.

Для этого необходимо следующее:

1. Прибор прогреть 25–30 минут.
2. Открыв крышку, установить в каретку против луча кювету с раствором с наименьшей концентрацией, рядом – кювету с водой.
3. Оба барабана прибора установить на «0».
4. Закрывать крышку и, открыв шторку ФЭКа, вывести стрелку потенциометра на «0» левым барабаном.
5. Закрывать шторку и поместить в луч кювету с водой, повернув ручку каретки до упора.
6. Открыть шторку, вывести стрелку потенциометра на «0» барабаном, расположенным на лицевой панели прибора.
7. Отсчитать значение экстинкции (оптической плотности) по красной шкале барабана, расположенного на лицевой панели прибора.
8. Повторить измерения для всех растворов.
9. Построить зависимость оптической плотности от концентрации раствора.

4. Определить с помощью калибровочного графика молярный коэффициент поглощения (ϵ) для каждого раствора.

Для этого необходимо найти тангенс угла наклона прямой на рисунке к оси X (рис. 4).

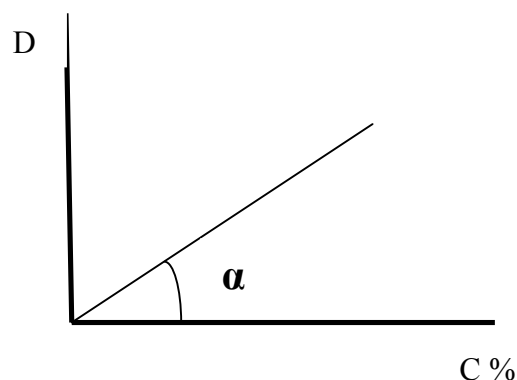


Рис. 4. Калибровочный график

$$\operatorname{tg} \alpha = \varepsilon l$$

Следует помнить, что $\operatorname{tg} \alpha$ равен отношению противолежащего катета (значение оптической плотности) к прилежащему катету (значение концентрации, выраженной в моль/л).

Перед вычислениями необходимо процентную концентрацию перевести в молярную. Для этого необходимо знать молекулярную массу сульфата меди и хлорида никеля.

Длина оптического пути l , по сути, является толщиной раствора в кювете. Этот параметр (в мм) указан на стенке кюветы.

Задание 1

Приготовить растворы CuSO_4 и NiCl_2 заданных концентраций.

Выбрать светофильтр для работы с этими растворами.

Задание 2

Определить с помощью калибровочного графика молярный коэффициент поглощения.

Вопросы для самоконтроля

1. Каков физический смысл молярного коэффициента поглощения?
2. Каковы приемы для определения молярного коэффициента поглощения?

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

Выберите один или несколько правильных ответов.

1. ЗАКОНУ БУГЕРА–ЛАМБЕРТА–БЕРА СООТВЕТСТВУЕТ ЗАПИСЬ

1) $D = \lg \frac{I_0}{I}$

2) $D = \lg \frac{I_0}{I} = \varepsilon c l$

3) $I = I_0 \cdot e^{-\varepsilon \cdot c \cdot l}$

4) $\operatorname{tg} \alpha = \varepsilon l$

2. УСЛОВИЯ ВЫПОЛНЕНИЯ ЗАКОНА БУГЕРА–ЛАМБЕРТА–БЕРА

- 1) свет монохроматический
- 2) разбавленный раствор исследуемого вещества
- 3) концентрация исследуемого раствора не важна
- 4) молекулы растворенного вещества хаотически расположены и не взаимодействуют друг с другом

3. ИНТЕНСИВНОСТЬ СВЕТА, ВЫШЕДШЕГО ИЗ ОБРАЗЦА, В ЗАВИСИМОСТИ ОТ КОНЦЕНТРАЦИИ УМЕНЬШАЕТСЯ

- 1) прямо пропорционально
- 2) экспоненциально
- 3) обратно пропорционально
- 4) логарифмически

4. ИНТЕНСИВНОСТЬ СВЕТА, ВЫШЕДШЕГО ИЗ ОБРАЗЦА, В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ДЛИНЫ ОПТИЧЕСКОГО ПУТИ УМЕНЬШАЕТСЯ

- 1) прямо пропорционально
- 2) экспоненциально
- 3) обратно пропорционально
- 4) логарифмически

5. ЗАКОН БУГЕРА – ЛАМБЕРТА–БЕРА ОПРЕДЕЛЯЕТ ЗАВИСИМОСТЬ ОПТИЧЕСКОЙ ПЛОТНОСТИ ОТ
- 1) молярного коэффициента поглощения
 - 2) концентрации вещества
 - 3) длины волны действующего света
 - 4) толщины кюветы
6. ЗАКОН ВАВИЛОВА ОПИСЫВАЕТ, ЧТО КВАНТОВЫЙ ВЫХОД ЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ
- 1) зависит от длины волны действующего света
 - 2) не зависит от длины волны действующего света
 - 3) зависит от молярного коэффициента поглощения вещества
 - 4) не зависит от молярного коэффициента поглощения вещества
7. ИНДУКТИВНО-РЕЗОНАНСНЫЙ ТИП МИГРАЦИИ ЭНЕРГИИ ПРОИСХОДИТ МЕЖДУ ВЕЩЕСТВОМ А И ВЕЩЕСТВОМ В, ЕСЛИ
- 1) возбужденный синглетный уровень вещества А располагается выше, чем возбужденный синглетный уровень вещества В
 - 2) возбужденный синглетный уровень вещества А располагается ниже, чем возбужденный синглетный уровень вещества В
 - 3) возбужденный триплетный уровень вещества А располагается ниже, чем возбужденный синглетный уровень вещества В
 - 4) возбужденные синглетные уровни веществ А и В располагаются на одном уровне
8. МОЛЯРНЫЙ КОЭФФИЦИЕНТ ПОГЛОЩЕНИЯ ХАРАКТЕРИЗУЕТ СПОСОБНОСТЬ ВЕЩЕСТВА
- 1) отражать свет
 - 2) поглощать свет
 - 3) пропускать свет
 - 4) рассеивать свет

СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ

Задача 1

Оптическая плотность раствора равна 0,08. Найдите его коэффициент пропускания.

Задача 2

В 4 % растворе вещества в прозрачном растворителе интенсивность света на глубине 20 мм ослабляется в 2 раза. Во сколько раз ослабится интенсивность света на глубине 30 мм в 8 % растворе этого же вещества?

Задача 3

Какова концентрация раствора, если одинаковая освещенность фотометрических полей была получена при толщине 8 мм у эталонного 3 % раствора и 24 мм – у исследуемого раствора?

Тема 6

СПЕКТРЫ ПОГЛОЩЕНИЯ БЕЛКОВ

Цель занятия: Исследовать методом ультрафиолетовой спектрофотометрии спектр поглощения трипсина.

Приборы и оборудование: спектрофотометр, наборы пробирок, мерных пипеток, растворы щелочи, хлорида натрия, трипсин, ароматические аминокислоты (тирозин, триптофан).

Вопросы для самоподготовки

1. Спектры поглощения сложных веществ (белков, нуклеиновых кислот и др.)
2. Принцип метода спектрофотометрии.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАТЬ

В современной биофизике находят широкое применение спектральные методы изучения биологических объектов. Важную информацию о структуре биополимеров позволяет получить ультрафиолетовая (УФ) спектрофотометрия.

Основным законом абсорбционной спектрофотометрии является закон Ламберта–Бера:

$$I = I_0 \cdot e^{-\varepsilon \cdot c \cdot l} \quad (1), \text{ где}$$

I – интенсивность света, вышедшего из раствора;

I_0 – интенсивность падающего света;

ε – молярный коэффициент поглощения, который характеризует поглощательную способность данного вещества;

c – концентрация раствора;

l – длина оптического пути.

Таким образом, закон Ламберта–Бера устанавливает, что интенсивность падающего света экспоненциально уменьшается в зависимости от концентрации раствора и длины оптического пути.

На практике часто используют закон Ламберта–Бера в логарифмической форме. Для этого вводится понятие оптической плотности раствора. Оптическая плотность D представляет собой десятичный

логарифм отношения начальной интенсивности к интенсивности света, вышедшего из образца:

$$D = \lg \frac{I_0}{I} \quad (2)$$

В логарифмической форме закон Ламберта–Бера устанавливает линейную зависимость между концентрацией раствора (c) и оптической плотностью (D) при постоянной длине оптического пути:

$$D = \varepsilon c l \quad (3)$$

Здесь обозначения те же, что и приведенные выше.

Свет разных длин волн поглощается веществом неодинаково. Зависимость оптической плотности (D) или молярного коэффициента поглощения (ε) от длины волны (λ) называется спектром поглощения.

Вещества могут поглощать свет в разных участках спектра. Условно весь спектральный диапазон делят на ультрафиолетовую, видимую и инфракрасную области. УФ-область лежит в интервале λ от 100 до 400 нм и разделяется на вакуумную (100–200 нм), среднюю (200–300 нм) и ближнюю (300–400 нм). Спектры поглощения белков лежат в средней УФ-области. Эмпирически найдены корреляции между химическим строением молекул и их спектрами. Наличие циклических структур с делокализованными π -электронами обуславливает поглощение УФ-света. Для белка характерно наличие двух максимумов поглощения: один – на границе вакуумной области (200–210 нм), а второй – в средней УФ-области (длинноволновый максимум поглощения). В вакуумной УФ-области поглощают все аминокислоты, а также пептидные связи. Длинноволновый максимум поглощения (240–300 нм) белков обусловлен поглощением трех ароматических аминокислот – триптофана, тирозина и фенилаланина. Поглощение света вызывает π – π^* -электронными переходами в плоскости ароматического кольца.

Спектрофотометрия позволяет определять количество тирозиновых и триптофановых остатков в белках. В нейтральных растворах поглощение белка при 280 нм представляется как сумма оптических плотностей тирозина и триптофана. Поскольку максимумы спектров поглощения этих аминокислот почти совпадают, измерить содержание этих аминокислот в белке при нейтральных рН трудно. В щелочной среде (при рН > 12) наблюдается спектральное разделение тирозинового и триптофанового поглощения. На этом основании Гудвин и

Мортон предложили метод определения содержания тирозиновых и триптофановых остатков в белке.

Метод Гудвина и Мортонa. Берется раствор белка с известной концентрацией C в 0,1 н щелочи. С помощью спектрофотометра находится оптическая плотность раствора белка на двух длинах волн 280 и 294 нм, а затем определяются молярные коэффициенты экстинкции:

$$\varepsilon_{280} = \frac{D_{280}}{cl} \quad (4)$$

$$\varepsilon_{294} = \frac{D_{294}}{cl} \quad (5), \text{ где}$$

l – толщина кюветы.

Число молей тирозина ($M^{тип}$) и триптофана ($M^{три}$) на моль белка будет равно:

$$M^{тип} = 10^{-3} (0,592\varepsilon_{294} - 0,263\varepsilon_{280}) \quad (6)$$

$$M^{три} = 10^{-3} (0,263\varepsilon_{280} - 0,170\varepsilon_{294}) \quad (7)$$

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Задание 1. Измерение спектров поглощения ароматических аминокислот.

Приготовить растворы в воде триптофана 0,0147 мг/мл, тирозина 0,053 мг/мл и снять их спектры поглощения в области от 210 до 320 нм через 5 нм. По полученным значениям оптических плотностей D найти молярные коэффициенты экстинкции триптофана и тирозина на 250 и 280 нм. Молекулярные массы: триптофана – 204,2; тирозина – 181,2.

Перевести растворы триптофана и тирозина в 0,1 н раствор NaOH, снять спектры поглощения и сравнить со спектрами поглощения нейтральных растворов в воде.

Задание 2. Измерение поглощение спектров поглощения трипсина.

Приготовить растворы трипсина в концентрации 0,1 и 0,2 мг/мл. Снять спектр поглощения. Приготовить раствор белка в 0,1 N щелочи. Снять спектр поглощения. Определить оптическую плотность на

280 и 294 нм, а затем определить молярные коэффициенты экстинкции по приведенным выше формулам (4 и 5). Найти количество триптофановых и тирозиновых остатков по методу Гудвина и Мортонна (6 и 7). Молекулярная масса трипсина 23000.

Порядок работы на спектрофотометре (СФ)

1. Включить компьютер.
2. Включить СФ.
3. В кюветное отделение поставить кюветы с измеряемыми образцами.
4. Запустить программу СФ.
5. Ввести имя пользователя.
6. Enter – 2 раза.
7. Выбрать рабочие параметры.
8. Выбрать диапазон длин волн, подходящих для данного образца.
9. В меню выбрать режим работы – «Регистрация спектров поглощения», нажать «Enter».
10. С помощью «Escape» вернуться в главное меню.
11. «Enter» – включение лампы, режим ожидания. После этого выбрать измеряемую величину – «D».
12. Отметить значком «√» (2 раза щелкнув мышкой) номера измеряемых образцов.
13. В меню выбрать опции, необходимые для работы: F3 – просмотр графика; F4 – измерение и т. д.
14. После окончания работы выйти из программы, нажав «Escape».

Вопросы для самоконтроля

1. В чем состоит принцип метода Гудвина и Мортонна? С какой целью используют этот метод?
2. Какие аминокислоты являются хромофорами в белках?

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

Выберите один или несколько правильных ответов.

1. СПЕКТР ПОГЛОЩЕНИЯ БЕЛКОВ – ЭТО ЗАВИСИМОСТЬ
 - 1) оптической плотности раствора от его концентрации
 - 2) молярного коэффициента поглощения от длины волны света
 - 3) длины волны от молярного коэффициента поглощения
 - 4) оптической плотности раствора от длины волны света

2. ПРИ ИНДУКТИВНО-РЕЗОНАНСНОМ ТИПЕ МИГРАЦИИ ЭНЕРГИИ ОСУЩЕСТВЛЯЕТСЯ ПЕРЕНОС ЭНЕРГИИ С
 - 1) S*-уровня донора на S*-уровень акцептора
 - 2) S*-уровня донора на T-уровень акцептора
 - 3) T-уровня донора на T-уровень акцептора
 - 4) основного S-уровня донора на S*-уровень акцептора

3. СКОРОСТЬ ФОТОХИМИЧЕСКОЙ РЕАКЦИИ НЕ ЗАВИСИТ ОТ
 - 1) интенсивности действующего света
 - 2) длины волны света
 - 3) концентрации реагирующего вещества
 - 4) молярного коэффициента поглощения реагирующего вещества

4. ЗАКОН ЛАМБЕРТА–БЕРА **НЕ ОПРЕДЕЛЯЕТ** ЗАВИСИМОСТЬ ОПТИЧЕСКОЙ ПЛОТНОСТИ ОТ
 - 1) длины оптического пути
 - 2) концентрации вещества
 - 3) длины волны действующего света
 - 4) молярного коэффициента поглощения

5. ИНТЕРКОМБИНАЦИОННАЯ КОНВЕРСИЯ ОСУЩЕСТВЛЯЕТСЯ ПРИ ПЕРЕХОДЕ ЭЛЕКТРОНА С
 - 1) возбужденного синглетного уровня на триплетный уровень
 - 2) возбужденного синглетного уровня на основной уровень
 - 3) нижнего возбужденного синглетного уровня на основной уровень
 - 4) высшего возбужденного синглетного уровня на нижний синглетный уровень

6. РАЗЛИЧАЮТ СЛЕДУЮЩИЕ ВИДЫ МИГРАЦИИ ЭНЕРГИИ
 - 1) индуктивно-резонансная
 - 2) триплет-триплетная
 - 3) экситонная
 - 4) полупроводниковая

7. ВНУТРЕННЯЯ КОНВЕРСИЯ СОПРОВОЖДАЕТСЯ
 - 1) высвечиванием кванта света
 - 2) выделением тепла

- 3) поглощением кванта света
- 4) поглощением тепла

8. ДЛИНА ОПТИЧЕСКОГО ПУТИ – ЭТО

- 1) толщина раствора в кювете
- 2) толщина кюветы с раствором
- 3) расстояние от источника света до кюветы с раствором
- 4) толщина кюветы без раствора

СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ

Задача 1

Ширина щели монохроматора спектрофотометра для раствора сравнения равна 0,1 мм, для исследуемого раствора – 0,038 мм. Чувствительность спектрофотометра – 2,0. Чему равна оптическая плотность раствора?

Учтите, что согласно формуле Хиски $I_1/I_0 = (s_0/s_1)^r$. I_0 и I_1 – интенсивности излучения, прошедшего через раствор сравнения и исследуемый раствор, где s_0 и s_1 – ширина щели монохроматора при исследовании раствора сравнения и изучаемого растворов; r – чувствительность спектрофотометра.

Задача 2

Определите квантовый выход люминесценции вещества, если его оптическая плотность равна 0,06, а интенсивность люминесценции (I_1) в 5 раз меньше интенсивности возбуждающего света. Учтите, что $I_1 = 2,3I_0\Phi_D$.

Задача 3

Во сколько раз уменьшится интенсивность флуоресценции триптофана в сывороточном альбумине человека, если в раствор был добавлен тушитель флуоресценции в концентрации 10^{-3} М, а тушение идет по триплетному типу?

Учтите, что согласно формуле Штерна–Фольмера $U/U_T = 1 + k\tau C_T$. Здесь U и U_T – наблюдаемая величина интенсивности флуоресценции при отсутствии тушителя флуоресценции и вместе с ним; C_T – молярная концентрация тушителя; τ – время жизни молекулы в возбужденном состоянии; $k = 10^9 \text{ М}^{-1}\text{с}^{-1}$. Если $\tau \cong 1$ нс, то наблюдается синглетный механизм тушения флуоресценции, если $\tau \cong 1$ мкс, то тушение идет по триплетному механизму.

Тема 7

ИССЛЕДОВАНИЕ ДИФФУЗИИ ВЕЩЕСТВ ЧЕРЕЗ ПОЛУПРОНИЦАЕМУЮ МЕМБРАНУ

Цель занятия с помощью фотометрического метода определить константу проницаемости биологической мембраны

Приборы и оборудование: фотоэлектроколориметр, набор пробирок в штативе и мерных пипеток, 0,5 % раствор метиленового синего, химические стаканчики, цилиндры от шприца, нитки, набор препаровальных инструментов. В качестве биологической мембраны можно использовать кожу лягушки, стенку кишки и др.

Вопросы для самоподготовки

1. Структура биологической мембраны.
2. Полупроницаемость биомембран: значение и механизмы.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Метиленовый синий используется в биологии для оценки функционального состояния живых тканей. Это вещество с молекулярной массой 350 дальтон и размерами молекул порядка 1,2 нм.

Проницаемость интактной мембраны для данного красителя весьма мала. После ее обработки детергентами диффузия метиленового синего через мембрану значительно усиливается. В этом случае процесс переноса вещества осуществляется в основном по механизмам пассивного транспорта, хотя и не может быть сведен к простой диффузии. Для количественной оценки проницаемости биомембран используется формула Коллендера и Берлунда:

$$\frac{dm}{dt} = PS(c_1 - c_2), \quad \text{где}$$

$\frac{dm}{dt}$ – скорость проникновения вещества (метиленового синего) через мембрану;

C_1 и C_2 – концентрация метиленового синего по разные стороны мембраны;

S – площадь мембраны через которую проходит диффузия;

P – константа проницаемости, зависящая от свойств мембраны, от параметров диффундирующего вещества (в частности от размеров молекулы) и от температуры.

Из формулы следует, что P – физическая величина, численно равная массе вещества, проникшей в единицу времени через единичную площадь мембраны при разности концентраций вещества с обеих ее сторон, равной единице. Следовательно, константа проницаемости характеризует скорость прохождения молекул красителя через мембрану.

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

При измерении скорости диффузии вещества в мг/мин, площадь мембраны – в см^2 , концентрации красителя – в $\text{мг}/\text{см}^3$, P измеряется в $\text{см}/\text{мин}$. Константа проницаемости зависит от температуры, поэтому опыт следует проводить при строго определенной температуре мембраны и растворов. Заметим, что на величину P влияет также длительность обработки кожи детергентом.

При проведении эксперимента мембрану (квадрат со стороной 2,5 см) помещают в кювету, которую следует приготовить самим, используя цилиндр от шприца и химический стакан. Мембрана должна представлять собой «дно» кюветы.

В цилиндр шприца наливают раствор метиленового синего определенной концентрации, а в химический стаканчик – дистиллированную воду.

Масса метиленового синего, продиффундировавшего из цилиндра в стаканчик через мембрану, определяется с учетом концентрации препарата в стаканчике. Для этого определяют оптическую плотность раствора из стаканчика на фотоэлектроколориметре.

Затем, используя калибровочный график (см. практическую работу «Освоение метода фотоэлектроколориметрии»), определяют концентрацию раствора метиленового синего. Поскольку водный раствор метиленового синего имеет максимум поглощения при длине волны 660 нм, в работе используется красный светофильтр.

Задание 1

1. Приготовить препарат мембраны.
2. Зафиксировать мембрану в созданной кювете. В стаканчик налить дистиллированную воду.

3. Заполнить цилиндр 0,1 % раствором метиленового синего. Объемы дистиллированной воды и раствора метиленового синего должны быть одинаковыми.

4. Оставить кювету на 40–45 минут для прохождения процесса диффузии. В течение этого времени определить оптическую плотность стандартных растворов метиленового синего на фотоэлектроколориметре и по полученным данным построить калибровочный график. Полученные данные занести в таблицу 6.

Таблица 6

Стандартные растворы	N1	N2	N3	N4	N5
Концентрация (%)	0,05	0,04	0,03	0,02	0,01
Оптическая плотность					

5. Определить массу (мг) метиленового синего, продиффундировавшего через мембрану. Отобрать из стаканчика определенный объем раствора. Определить его оптическую плотность (D). По калибровочному графику найти концентрацию раствора метиленового синего C_x .

Зная общий объем раствора в стаканчике (V_0), вычислить массу красителя, продиффундировавшего через мембрану:

$$m = c_x \cdot V_0$$

6. Подсчитать константу диффузии для метиленового синего. Для этого решить уравнение Коллендера и Берлунда относительно P:

$$P = \frac{m}{\Delta c S t} = \frac{4m}{c_1 \cdot \pi d^2 t}, \text{ где}$$

m – масса вещества (мг), продиффундировавшего через мембрану за время эксперимента (t, мин);

S – площадь мембраны, через которую проходила диффузия (см²):

$$S = \frac{\pi d^2}{4}, \quad \text{где}$$

d – диаметр цилиндра (см);

ΔC – разность концентраций по обе стороны мембраны (мг/см³).

Полученные результаты занести в протокол опыта (табл. 7).

Таблица 7

D_x	C_x	M	t	C_1	D	P

Вопросы для самоконтроля

1. Каковы методы исследования биологических мембран?
2. Каковы виды пассивного мембранного транспорта?
3. Каковы уравнения для описания процесса диффузии?

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

Выберите один или несколько правильных ответов.

1. КЛЕТОЧНЫЕ МЕМБРАНЫ ВЫПОЛНЯЮТ ФУНКЦИИ
 - 1) рецепторная
 - 2) транспортная
 - 3) мышечное сокращение
 - 4) межклеточные взаимодействия
2. РЕГУЛЯЦИЮ МИКРОВЯЗКОСТИ МЕМБРАН ОСУЩЕСТВЛЯЕТ
 - 1) холестерин
 - 2) фосфатидилхолин
 - 3) сфингомиелин
 - 4) сульфатид
3. К МЕМБРАННЫМ БЕЛКАМ ОТНОСЯТСЯ
 - 1) ферментативные
 - 2) структурные
 - 3) сократительные
 - 4) рецепторные
4. СОГЛАСНО ТОПОДИНАМИЧЕСКОЙ КЛАССИФИКАЦИИ ВЫДЕЛЯЮТ БЕЛКИ
 - 1) периферические
 - 2) интегральные
 - 3) политопические
 - 4) монотопические

5. УГЛЕВОДЫ В МЕМБРАНЕ ВЫПОЛНЯЮТ СЛЕДУЮЩИЕ ФУНКЦИИ

- 1) транспортная
- 2) рецепторная
- 3) окислительная
- 4) межклеточные контакты

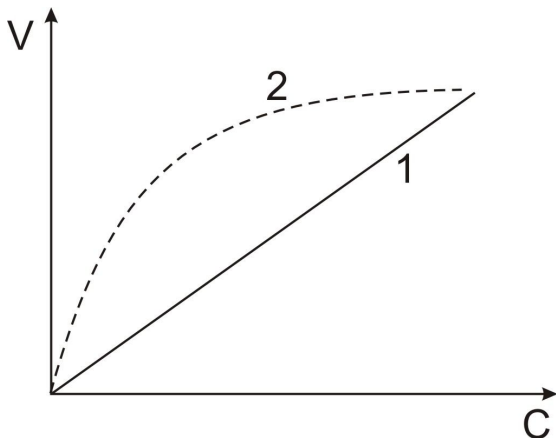
6. МОЗАИЧНУЮ МОДЕЛЬ МЕМБРАНЫ ПРЕДЛОЖИЛИ

- 1) Сенгер и Николсон
- 2) Даниэли и Давсон
- 3) Варбург и Негелейн
- 4) Гортер и Грендель

7. УГЛЕВОДЫ В МЕМБРАНАХ ПРИСУТСТВУЮТ В ВИДЕ

- 1) гликопротеинов
- 2) протеогликанов
- 3) гликолипидов
- 4) полисахаридов

8. ГРАФИК 2 НА РИСУНКЕ ОПИСЫВАЕТ



- 1) простую диффузию
- 2) транспорт ионов через каналы
- 3) облегченную диффузию
- 4) неспецифическую диффузию

9. УРАВНЕНИЕ $\frac{dm}{dc} = -DS \frac{dc}{dx}$ ОПИСЫВАЕТ

- 1) облегченную диффузию
- 2) транспорт ионов с помощью белков-переносчиков
- 3) простую диффузию

4) транспорт ионов с помощью АТФаз

10. УРАВНЕНИЕ $J_s = \frac{J_{\max} [S]}{K_T + S}$ ОПИСЫВАЕТ

- 1) облегченную диффузию
- 2) транспорт ионов с помощью белков-переносчиков
- 3) простую диффузию
- 4) транспорт ионов с помощью АТФаз

СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ

Задача 1

Чему равен поток формамида через плазматическую мембрану *Chara seratorphylla* толщиной 8 нм, если коэффициент диффузии его составляет $1,4 \cdot 10^{-8} \text{ см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$, концентрация формамида в начальный момент времени снаружи была равна $2 \cdot 10^{-4} \text{ М}$, а внутри в 10 раз меньше.

Задача 2

Бислойная липидная мембрана (БЛМ) толщиной 10 нм разделяет камеру на две части. Поток метиленового синего через БЛМ постоянен и равен $3 \cdot 10^{-4} \text{ М} \cdot \text{см} / \text{с}$, причем концентрация его с одной стороны мембраны равна 10^{-3} М , а с другой – $2 \cdot 10^{-3} \text{ М}$. Чему равен коэффициент диффузии этого вещества через БЛМ?

Задача 3

Определите коэффициент диффузии в воде эритрола, если среднее смещение его молекулы составляет 40 мкм.

Тема 8

ОПРЕДЕЛЕНИЕ рК АМИНОКИСЛОТ

Цель занятия: определить рК аминокислоты аланин.

Приборы и оборудование: стандартный буферный раствор, раствор исследуемой аминокислоты (аланин), 0,1 н КОН, мерные пипетки с ценой деления 0,05–0,1 мл, рН-метр

Вопросы для самоподготовки

1. Взаимосвязь понятий рН и рК.
2. Принцип работы рНметра.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Для регистрации рН растворов биологически активных веществ внутриклеточного матрикса широко применяется рН-метрия. Определение рН необходимо в связи с тем, что многие биохимические процессы зависят от степени ионизации молекул, которые принимают в них участие. К таким процессам относятся реакции, катализируемые ферментами, процесс переноса кислорода при участии гемоглобина, конформационные изменения белков и других биополимеров, поведение малых и больших молекул при электрофоретическом и хроматографическом разделении и т. д.

Понятие рН и рК

Равновесие диссоциации воды записывается в виде такого урав-

нения:

$$H_2O + H_2O \rightleftharpoons H_3O^+ + OH^-$$

С помощью электропроводности показано, что диссоциация воды незначительна и при $T=238K$ константа равновесия равна:

$$K = [H_3O^+] \cdot \frac{[OH^-]}{[H_2O]^2} = 3,24 \cdot 10^{-18} M$$

Будем рассматривать достаточно разбавленные растворы, когда концентрация воды очень высокая и равна числу граммов H_2O в 1 л, деленному на молекулярную массу, т. е. $H_2O=1000/18=55,5 M$. Кроме того, поскольку раствор электронейтральный, концентрации ионов H_3O^+ и OH^- одинаковы. Можно найти ионное произведение воды:

$$K_w = [H_3O^+] \cdot [OH^-] = [55,5]^2 \cdot 3,24 \cdot 10^{-18} = 10^{-14} M$$

Таким образом, $[H_3O^+] = [OH^-] = 10^{-7} M$

Если концентрации ионов H_3O^+ и OH^- одинаковы и равны $10^{-7} M$, то такой раствор называют нейтральным. Для краткой записи концентрации ионов H_3O^+ (или концентрации H^+) Соренсон в 1920 году ввел так называемую шкалу рН. Величина рН определяется так:

$$pH = -\lg[H_3O^+]$$

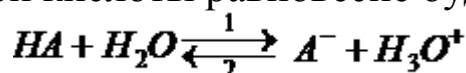
Для нейтрального раствора $pH = -\lg[10^{-7}] = 7$. Для водного раствора связь между концентрациями ионов H_3O^+ и OH^- будет записана так:

$$\lg([H_3O^+] \cdot [OH^-]) = \lg[H_3O^+] + \lg[OH^-] = 14$$

Тогда, если $pOH = -\lg[OH^-]$, то можно записать $pH + pOH = 14$

Раствор называют кислым, если концентрация ионов H_3O^+ больше $10^{-7} M$, т. е. $pH < 7$, и наоборот, щелочному раствору отвечает большая концентрация OH^- , т. е. $pH > 7$.

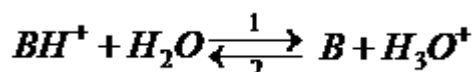
По теории Бренстеда, кислота тем сильнее, чем легче она отдает протон воде. Для сильной кислоты равновесие будет иметь такой вид:



кислота

сопряженное основание

или



Равновесие смещено в направлении 1, таким образом, сильная кислота характеризуется большей величиной константы диссоциации K_a , которая равна

$$K_a = \frac{[H_3O^+][A^-]}{[HA]} \quad \text{или} \quad K_a = \frac{[H_3O^+][B^-]}{[BH^+]}$$

Теоретически «сильная кислота» – та, которая полностью диссоциирует в водном растворе. Практически при $K_a > 2$ или 3 кислоту считают полностью диссоциированной. Силу кислоты характеризуют величиной pK_a :

$$pK_a = -\lg K_a$$

Для сильных кислот величины pK_a отрицательные, для слабых – положительные.

Чем слабее кислота, тем больше величина pK_a этой кислоты.

Титрование слабой кислоты сильным основанием

При титровании кислоты добавлением порций сильного основания наблюдается изменение рН раствора. Кривая титрования – графическое изображение изменений величины рН вследствие добавления эквивалентов титрата. Такая кривая может быть описана уравнением Гендерсона–Хассельбаха.

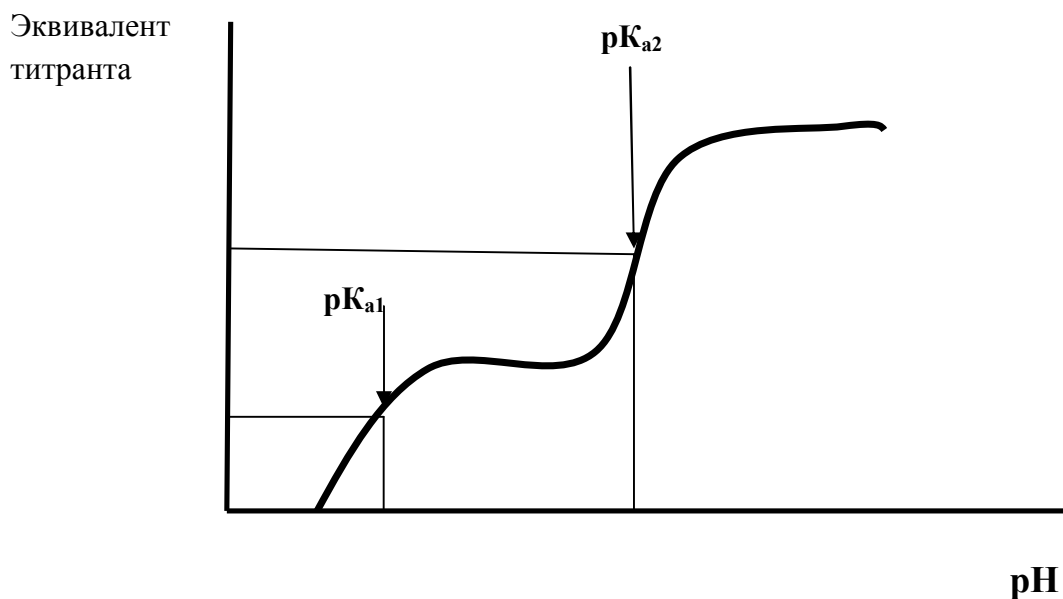


Рис. 5. Кривая титрования двухосновной аминокислоты

$$K_a = \frac{[H_3O^+][A^-]}{[HA]}$$

Найдем из этого уравнения концентрацию $[H_3O^+]$:

$$[H_3O^+] = K_a \frac{[HA]}{[A^-]}$$

Прологарифмируем это выражение с обратным знаком

$$-\lg[H_3O^+] = -\lg K_a - \lg \frac{[HA]}{[A^-]} \text{ или}$$

$$pH = pK_a - \lg \frac{[HA]}{[A^-]}$$

Изменим знак «-» на «+»

$$pH = pK_a + \lg \frac{[A^-]}{[HA]} = pK_a + \lg \frac{[\text{основание}]}{[\text{кислота}]}$$

Из этого уравнения следует, что $pK_a = pH$ в условиях, когда половина молекул кислоты находится в диссоциированной форме, а половина – в ассоциированной.

Кривая титрования аминокислоты характеризует две ступени диссоциации: pK_{a1} отвечает ионизации карбоксильной группы, pK_{a2} – ионизации аминогруппы.

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Методика работы на рН-метре ЛМП-60 М. Для измерения величины рН используется электродная система со стеклянным электродом, электродвижущая сила которого зависит от активности ионов водорода в растворе.

Стеклянный электрод представляет собой трубку с припаянным к корпусу шариком из литиевого стекла. При опускании электрода в раствор, между поверхностью шарика и раствором происходит обмен ионами, в результате которого ионы лития в поверхностных слоях стекла замещаются ионами водорода и стеклянный электрод приобретает свойства водородного электрода.

Между поверхностью стекла и раствором возникает разница потенциалов E_x , величина которой определяется активностью ионов водорода в растворе. Для создания электрической цепи при измерении используют контактные электроды. Внутренний контактный электрод обеспечивает электрический контакт с раствором, заполняющим внутреннюю часть стеклянного электрода, а внешний контактный электрод (так называемый электрод сравнения) обеспечивает электрический контакт с контрольным раствором. Для защиты от действия высоких температур при измерении рН горячих растворов электрод сравнения располагают вне контрольного раствора и соединяют с последним при помощи электролитного контакта – трубки, заполненной насыщенным раствором хлорида калия. Раствор хлорида калия все время просачивается через пористую перегородку, мешает проникновению контрольного раствора в систему электрода посторонних ионов, которые могли бы изменить величину электродвижущей силы электрода.

Последовательность операций при работе на рН-метре ЛМП-60 М:

1. Переключатель рода работ поставить в положение «0».
2. Включить прибор в электросеть.
3. После 15-минутного прогрева прибора перевести переключатель в положение, отвечающее необходимому измерению. Установить стрелку прибора на начальную (-2pH) отметку верхней шкалы).
4. Настроить прибор по стандартному буферному раствору. Для этого электроды поместить в стандартный раствор 1,68 pH. Переключатель границ измерений установить в положение «-2 – 2pH». Показатель температурной компенсации установить на значение буферного раствора (при ручной температурной компенсации). Удостовериться, что в нулевом положении переключателя рода работ положение стрелки отвечает начальной отметке верхней шкалы. При необходимости установить ее на начальную отметку ручкой «Начало шкалы». Перевести переключатель рода работ в положение «pH». Ручкой «Настройка по буферу» установить стрелку на значение 1,68 pH по верхней шкале. Затянуть ручку цанговым зажимом. После этого прибор готов к измерению.

Задание 1. Снятие кривой титрования аланина.

1. Подготовить прибор к работе согласно методике, изложенной выше (после измерения pH стандартного буфера его нужно вылить назад в колбу).
2. В стаканчик для исследований раствора при помощи пипетки набрать 20 мл 0,1 М раствора аминокислоты (аланина). Измерить его pH.
3. Протитровать этот раствор сильной щелочью (0,1 Н раствор КОН). Для этого в стаканчик с аланином пипеткой добавить 0,5 мл щелочи. Смесь перемешать стеклянной палочкой или с помощью магнитной мешалки и измерить pH. Операцию повторить, каждый раз прибавляя к раствору аланина порцию щелочи объемом 0,5 мл. После четвертого измерения объем щелочи увеличить до 2 мл. Титрование остановить после того, как объем внесенной в стаканчик щелочи будет равняться начальному объему аланина (20 мл).
4. В стаканчик с пометкой «Дистиллированная вода» набрать дистиллят и отмыть электроды от остатков предыдущего раствора. Дистиллированную воду в стаканчике менять несколько раз (дистиллят при хорошо отмытых электродах имеет pH=5,6 –6,0).

5. Протитрованную аминокислоту вылить, стаканчик аккуратно помыть дистиллированной водой и набрать в него новую порцию аминокислоты (20 мл). Раствор протитровать сильной кислотой (0,1 N раствор HCl) точно по указаниям пункта 3.

6. Результаты обоих титрований заносят в таблицу 8.

Таблица 8

Титрование щелочью				
№ измерения	Объем прибавленной щелочи	Сумма объемов прибавленной щелочи	Эквивалент прибавленной щелочи	pH раствора
1	0	0	0	
2	0,5	0,5	0,025	
3	0,5	1	0,05	
4	0,5	1,5	0,075	
5	0,5	2	0,1	
6	2	4	0,2	
7	2	6		
Титрование кислотой				
1	0	0	0	
2	0,5	0,5	0,025	
3	0,5	1	0,05	
4	0,5	1,5		
5	0,5	2		
6	2	4		
7	2	6		

Примечание. Поскольку концентрации растворов щелочи, кислоты и аланина выражены в г-экв/л, то эквивалент прибавленной кислоты и щелочи определяют из простого соотношения.

7. После окончания титрования отмыть электроды (см. пункт 4). Электроды не должны длительное время оставаться сухими, поэтому их помещают в дистиллированную воду. Использованные растворы вылить, стаканчики аккуратно помыть водой.

$$\frac{\text{эквивалент прибавленной кислоты(щелочи)}}{\text{кислота(щелочи)}} = \frac{\text{сумма объемов прибавленной кислоты(щелочи)}}{\text{начальный объем аминокислоты}}$$

Задание 2. Определение константы диссоциации аланина.

1. Используя данные таблицы, построить график, подобный изображению на рисунок 1.

2. Из графика найти значения pK_{a1} , pK_{a2} , где pK_{a1} и pK_{a2} – проекции точек перегиба кривой на шкалу pH (см. рис. 1).
3. Рассчитать константы диссоциации аланина.

Вопросы для самоконтроля

1. В чем состоит принцип метода потенциометрического титрования?
2. Какие ионогенные группы содержат белки?
3. При каких условиях pK равно pH ?

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

Выберите один или несколько правильных ответов.

1. В СОСТАВ АМИНОКИСЛОТ МОГУТ ВХОДИТЬ
 - 1) аминогруппа
 - 2) карбоксигруппа
 - 3) гидроксильная группа
 - 4) метильная группа
2. ПЕПТИДНАЯ СВЯЗЬ МЕЖДУ АМИНОКИСЛОТНЫМИ ОСТАТКАМИ ОСУЩЕСТВЛЯЕТСЯ МЕЖДУ АЗОТОМ И
 - 1) кислородом
 - 2) водородом
 - 3) углеродом
 - 4) серой
3. ВОЗМОЖНОСТЬ ВЫПОЛНЯТЬ БУФЕРНЫЕ СВОЙСТВА АМИНОКИСЛОТАМ ПРИДАЕТ
 - 1) аминогруппа
 - 2) карбоксигруппа
 - 3) SH-группы
 - 4) гидроксильные группы
4. ОСОБЕННОСТЬ ПЕПТИДНОЙ СВЯЗИ ЗАКЛЮЧАЕТСЯ В ТОМ, ЧТО
 - 4) атомы, ее образующие, лежат в одной плоскости
 - 5) она носит частично двойной характер
 - 6) поворот вокруг нее крайне затруднен
 - 7) поворот вокруг нее легко осуществим

5. КОЛИЧЕСТВО АМИНОКИСЛОТ, ВХОДЯЩИХ В СОСТАВ БЕЛКА
- 1) 25
 - 2) 23
 - 3) 20
 - 4) 18
6. АМИНОКИСЛОТЫ ОБЛАДАЮТ СВОЙСТВАМИ
- 1) кислот
 - 2) нейтральных соединений
 - 3) амфотерных соединений
 - 4) щелочей
7. pH РАВНО pK ПРИ УСЛОВИИ, ЧТО
- 1) использован разбавленный раствор слабой кислоты
 - 2) все молекулы диссоциированы
 - 3) все молекулы ассоциированы
 - 4) количество диссоциированных молекул равно количеству недиссоциированных
8. СИЛУ КИСЛОТЫ ХАРАКТЕРИЗУЕТ
- 1) полная ассоциация
 - 2) полная диссоциация
 - 3) отрицательное значение pK
 - 4) положительное значение pK
9. МАТЕМАТИЧЕСКИ ЗНАЧЕНИЕ pH РАВНО
- 1) концентрации ионов водорода
 - 2) отрицательному логарифму концентрации ионов водорода
 - 3) отрицательному логарифму концентрации ионов гидроксидов
 - 4) концентрации ионов гидроксидов
10. ЭЛЕКТРОД СРАВНЕНИЯ ОБЫЧНО ЗАПОЛНЕН РАСТВОРОМ
- 1) хлорида калия
 - 2) хлорида натрия
 - 3) сульфата калия
 - 4) сульфата натрия

СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ

Задача 1

Сколько потребуется титранта для определения рК аминокислоты аланин, если его концентрация вырастет в 3 раза, в 5 раз?

Задача 2

Как изменится рК аминокислоты, если ее концентрация в растворе снизится в 5 раз, повысится в 5 раз?

Задача 3

Можно ли проводить титрование аминокислот последовательно щелочью и кислотой, и каковы особенности этого процесса?

Тема 9

ПОТЕНЦИОМЕТРИЧЕСКОЕ ТИТРОВАНИЕ БЕЛКОВ

Цель занятия: построить кривую титрования трипсина и отметить области титрования ионогенных групп белков.

Приборы и оборудование: раствор белка, рН-метр, центрифуга, магнитная мешалка, набор стандартных буферов.

Вопросы для самоподготовки

1. Содержание заряженных групп в белках и методы их определения.
2. Понятия рН и рК.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Метод потенциометрического титрования биологических молекул достаточно стар: еще в 1921 г. были сняты кривые титрования белков. Этот метод позволяет исследовать количество и состояние заряженных групп на поверхности мембран, белков, вирусов, природу зарядов и их окружение. Он используется также для определения одной из важнейших физико-химических характеристик – константы ионизации ионогенных групп.

Принцип метода

Метод применим к тем веществам, химические группы которых способны при определенных условиях диссоциировать:



Константа диссоциации:

$$K_a = \frac{[A^-] \cdot [H^+]}{[AH]} \quad (2)$$

если активности A^- , H^+ , AH равны 1. Логарифмируя (2), получим:

$$\lg K_a = \lg \frac{[A^-]}{[AH]} + \lg [H^+] \quad (3)$$

Учтем, что $-\lg K_a = pK$ и $-\lg [H^+] = pH$, тогда:

$$\lg K_a = -pK = pH - \lg \frac{[A^-]}{[AH]} \quad (4)$$

Величина pK характеризует сродство данной химической группы к протону. Она определяется свободной энергией (ΔG) связи между протоном и данной группой:

$$\Delta G = -RT \cdot \ln K_a = -2,3 \cdot RT \cdot \lg K_a = 2,3 \cdot RT \cdot pK \quad (5), \text{ где}$$

R – универсальная газовая постоянная,

T – температура в К.

Как видно из уравнения (4) $pK_a = pH$, если

$$[A^-] = [AH], \text{ тогда } \frac{[A^-]}{[AH]} = 1,$$

$$-\lg \frac{[A^-]}{[AH]} = 0$$

Таким образом, $pK_a = pH$, при котором 50 % данных групп находится в диссоциированной форме.

При увеличении pH кислоты теряют протон и переходят в заряженную форму. Кислоты, имеющие низкие значения pK_a и сильно диссоциированные, называют сильными. Они слабо связывают протон. Слабые кислоты, напротив, имеют большое значение pK_a и сильно связывают протон.

Ионогенные группы белков

Аминокислоты, которые участвуют в синтезе белков, содержат две или более ионогенные группы: α -карбоксыльную и α -аминогруппу, а некоторые аминокислоты – боковую ионогенную группу. При образовании полипептидной цепи α -группы исчезают и остаются только боковые.

Присоединение или отдача H^+ зависит не только от сродства к нему химической группы, но и от ее окружения. Например, если вокруг данной группы находятся положительные заряды, то присоединение протона затруднено и значение pK_a снизится.

На значение pK_a могут влиять заряды вблизи данной группы: ионная сила раствора, упаковка этой группы в молекуле и т. д. Благодаря этим факторам величины pK_a для групп данного типа отличаются

ся как в разных белках, так и в разных участках одной и той же белковой молекулы.

Титрование белков

Растворы белков часто титруют от рН, который меньше наименьшей величины pK_a белковых групп (от рН=3) в щелочную среду. При этом можно полагать, что в исходной точке титрования все группы белка находятся в недиссоциированном состоянии, т. е. связаны с H^+ .

В связи с тем, что в белках имеется несколько типов групп разными pK , кривая титрования обычно пологая и не имеет четких перегибов, свойственных ионогенным группам. В этом случае кривую разбивают на области, соответствующие областям титрования тех или иных групп, и количество групп и среднюю величину их pK_a определяют в каждой области.

При переходе от кислых рН к щелочным меняется заряд белка. Точка, в которой количество отрицательно и положительно заряженных групп равно, называется изоэлектрической (рI).

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

1. Собрать установку для регистрации рН.
2. Прокалибровать прибор по стандартным буферным растворам.
3. Приготовить растворы:
 - а) 10 мл 0,1 М NaCl (раствор А) в воде;
 - б) 10 мл 2 М NaCl (раствор Б) в воде;
 - в) 5 мл раствора трипсина (раствор Т) (м. в. 24000) в концентрации 6 мг/мл в растворе А. Для полного растворения добавляют каплю щелочи;
 - г) 0,1 н NaOH.
4. Смешивают 5 мл раствора Т и 5 мл раствора Б, рН доводят 0,1 н HCl до значений, близким к 3.
5. Полученный раствор титруют 0,1 н раствором NaOH до значений рН 11–12. Для этого стаканчик с 10 мл приготовленного раствора помещают на магнитную мешалку. Титрант (0,1 н NaOH) добавляют малыми порциями с помощью дозатора или шприца, при этом рН должен меняться не больше, чем на 0,2–0,3 единицы. Регистрируют

расход титранта T на соответствующий сдвиг pH и общий расход T от начала титрования.

6. Титруют растворитель без белка (показатели pH и T). Данные п. 5 и 6 заносят в таблицу 1.

7. Построить график зависимости T_1 и T_2 от pH . Найти разницу $T=T_2 - T_1$ и построить график зависимости T от pH . Это и есть кривая титрования белка.

8. Отметить на этой кривой области титрования ионогенных групп в трипсине.

9. Определить количество ионогенных групп в белке. Для этого необходимо знать количество протонов (n):

$$n = T \cdot \frac{C_T}{V} \cdot C_B \cdot \frac{1}{M} \quad (6), \quad \text{где}$$

$T=T_2 - T_1$ – расход титранта на титрование белка, л;

C_T – концентрация титранта, моль/л;

C_B – концентрация белка, г/л;

V – объем титруемого раствора белка, л;

M – молекулярный вес белка, грамм/моль.

Вопросы для самоконтроля

1. Для чего используется потенциометрическое титрование белков?
2. Какие известны методы для определения аминокислотного состава белков?

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

Выберите один или несколько правильных ответов.

1. НА ОДИН ВИТОК α СПИРАЛИ ПРИХОДИТСЯ АМИНОКИСЛОТ
 - 1) 3,0
 - 2) 3,6
 - 3) 4,0
 - 4) 4,6
2. ВОДОРОДНЫЕ СВЯЗИ В α -СПИРАЛИ ОБРАЗУЮТСЯ МЕЖДУ ОСТАТКАМИ АМИНОКИСЛОТ
 - 1) 1 и 2
 - 2) 1 и 3
 - 3) 1 и 4

- 4) 2 и 3
3. ПЕПТИДНАЯ ГРУППА БЕЛКА СОСТОИТ ИЗ АТОМОВ
- 1) азота
 - 2) водорода
 - 3) кислорода
 - 4) углерода
4. ТРЕТИЧНУЮ И ЧЕТВЕРТИЧНУЮ СТРУКТУРЫ БЕЛКА СТАБИЛИЗИРУЮТ
- 1) ковалентные связи
 - 2) дисперсионное взаимодействие
 - 3) гидрофобные взаимодействия
 - 4) электростатические силы
5. ПЕПТИДНАЯ СВЯЗЬ МЕЖДУ АМИНОКИСЛОТНЫМИ ОСТАТКАМИ ОСУЩЕСТВЛЯЕТСЯ
- 1) ковалентной связью
 - 2) дисперсионным взаимодействием
 - 3) гидрофобным взаимодействием
 - 4) электростатическими силами
6. В ОСНОВЕ рК БЕЛКОВ ЛЕЖИТ НАЛИЧИЕ В НИХ
- 1) гидроксигрупп
 - 2) сульфогрупп
 - 3) ароматических составляющих
 - 4) аминогрупп
7. ИЗОЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ ТОЧКОЙ pI НАЗЫВАЮТ ЗНАЧЕНИЕ pH , ПРИ КОТОРОМ КОЛИЧЕСТВО
- 1) отрицательных и положительных групп равно
 - 2) отрицательных групп больше положительных
 - 3) положительных больше отрицательных
 - 4) отрицательных меньше положительных
8. ХАРАКТЕР КРИВОЙ ТИТРОВАНИЯ БЕЛКА ПОЗВОЛЯЕТ ПРЕДПОЛОЖИТЬ НАЛИЧИЕ В НЕМ АМИНОКИСЛОТ, СОДЕРЖАЩИХ
- 1) гидроксигруппы
 - 2) сульфогруппы
 - 3) ароматически группы

4) метильные группы

9. ВОДОРОДНЫЕ СВЯЗИ СТАБИЛИЗИРУЮТ СТРУКТУРУ БЕЛКА

- 1) первичную
- 2) вторичную
- 3) третичную
- 4) четвертичную

10. ПРИРОДА ГИДРОФОБНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ, УЧАСТВУЮЩИХ В ОБРАЗОВАНИИ ТРЕТИЧНОЙ И ЧЕТВЕРТИЧНОЙ СТРУКТУР БЕЛКА, СВЯЗАНА С

- 1) взаимным притяжением неполярных групп
- 2) отталкиванием полярных и неполярных групп
- 3) отталкиванием молекул воды неполярными группами
- 4) отталкиванием водой неполярных групп

СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ

Задача 1

Изменится ли характер кривой титрования трипсина при его нагревании?

Задача 2

Различаются ли и почему области титрования ионогенных групп различных белков?

Задача 3

Можно ли в качестве дифференциального критерия разных белков использовать их кривые титрования и показания рК?

Тема 10

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЗАВИСИМОСТИ ПОВЕРХНОСТНОГО НАТЯЖЕНИЯ МОНОСЛОЯ ЛЕГОЧНОГО СУРФАКТАНТА ОТ РАЗМЕРОВ ЕГО ПОВЕРХНОСТИ

Цель занятия: Изучить роль сурфактанта в изменении сил поверхностного натяжения жидкости.

Приборы и оборудование: препарат легких теплокровного животного (крысы, морская свинка и др.), набор препаровальных инструментов, весы Вильгельми–Ленгмюра, ванночка с подвижным ограничителем, ступка.

Вопросы для самоподготовки

1. Силы поверхностного натяжения в биосистемах.
2. Эластическая тяга легких, роль сурфактанта.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Известно, что в поверхностном слое жидкости действует сила, стремящаяся сократить его площадь. Если значение поверхностного натяжения умножить на величину площади поверхности, полученная величина будет иметь размерность энергии и называться свободной поверхностной энергией. Как и всякая система, поверхность стремится иметь минимум энергии, а у чистой жидкости единственный путь для этого – сокращение самой поверхности. Однако, если в жидкости присутствуют вещества, способные уменьшить поверхностную энергию, они устремятся на поверхность, образуя поверхностную пленку. Такие вещества называются поверхностно-активными (ПАВ). При их невысокой концентрации могут формироваться адсорбированные мономолекулярные слои, в которых развивается поверхностное давление P , равное:

$$P = \sigma_{ж} - \sigma_{м} (1), \quad \text{где}$$

$\sigma_{ж}$ – поверхностное натяжение чистой жидкости;

$\sigma_{м}$ – поверхностное натяжение монослойной пленки.

При сжатии или растяжении величина поверхностного монослоя изменяется. В зависимости от этого варьирует и поверхностное натяжение. Чем больше сжимается пленка (повышается концентрация мо-

лекул в расчете на единицу площади поверхности), тем больше падает поверхностное натяжение σ_m , тем выше становится поверхностное давление P , т. к. $\sigma_{ж}$ величина постоянная для физиологического раствора и дистиллированной воды – $72 \cdot 10^{-3}$ Н/м.

Подобный процесс имеет место в легочных альвеолах, когда находящийся на их поверхности монослой сурфактанта при вдохе сокращает свою поверхность. Поверхностное давление в монослое нарастает и препятствует спадению альвеол даже при глубоком выдохе. Иногда у новорожденных в легких имеет место недостаточность продукции сурфактанта, тогда развивается картина легочной недостаточности.

Альвеолу можно представить в виде полусферы, образованной упругой пленкой. При этом давление P , требуемое для раздувания ее стенки до определенного объема, будет зависеть от радиуса кривизны поверхности (r) и величины поверхностного натяжения (σ). Данные значения связаны уравнением Лапласа:

$$P = 2\sigma / r(2)$$

Отсюда следует: чем меньше радиус альвеолы, тем более высокое давление требуется для предотвращения ее полного коллапса.

Зависимость величины поверхностного натяжения сурфактанта от площади графически выражается замкнутой кривой (петля гистерезиса), площадь которой численно равна энергии, расходуемой на сжатие-растяжение. Эта энергия характеризуется индексом стабильности (ИС) мономолекулярной пленки:

$$ИС = 2(\sigma_{\max} - \sigma_{\min}) / (\sigma_{\max} + \sigma_{\min})(3), \text{ где}$$

σ_{\max} – максимальное поверхностное натяжение, соответствующее 100 % площади монослоя (начало сжатия);

σ_{\min} – минимальное поверхностное натяжение, соответствующее 20 % площади монослоя (конец сжатия).

Индекс стабильности отражает способность ПАВ формировать стабильную пленку на границе раздела фаз. В нормальных условиях ИС для альвеол млекопитающих должен быть не менее 0,8. Более низкие его значения сигнализируют о возможных нарушениях дыхания, вызванных дефицитом сурфактанта или частичной потерей поверхностно-активных свойств.

В ходе дыхательных экскурсий альвеолы ритмично уменьшают и увеличивают свою поверхность. При этом поверхностное давление

в монослое сурфактанта претерпевает закономерные изменения. Способ Вильгельми-Ленгмюра позволяет исследовать эту закономерность.

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

1. Изучить устройство и принцип работы весов Вильгельми-Ленгмюра. Они представляют собой видоизмененные торсионные весы (тип ВТ-500), где вместо чашечки на тонком стержне подвешена тонкая стеклянная (кварцевая, тефлоновая или платиновая) пластинка, к которой подводится кювета с жидкостью. При соприкосновении поверхности с пластинкой последняя в результате смачивания втягивается внутрь жидкости. Для отрыва пластинки от жидкости требуется приложить отрывающее усилие F , связанное с силой поверхностного натяжения соотношением:

$$F = 2\sigma(l + a)(4), \quad \text{где}$$

σ – коэффициент поверхностного натяжения;

F – сила, затрачиваемая на отрыв частично погруженной в жидкость пластинки, от поверхности жидкости (дин);

l – ширина пластинки (см);

a – толщина пластинки (см).

Если известны размеры пластинки и величина разрывающего усилия F , имеем:

$$\sigma = F / 2(l + a)(5)$$

Величину силы можно определить непосредственно при помощи торсионных весов по методу «отрыва», проградуировав шкалу в динах. Цена деления весов-1 мг или 0,98 дин. При подвешивании покровного стекла размером 2,2х2,2х0,01 см к рычагу торсионных весов (это легко сделать с помощью клея БФ-2), цена их деления в единицах поверхностного натяжения k равна:

$$k = \frac{0,98 \text{дин} / \text{дел}}{2(2,2 + 0,01) \text{см}} = 0,22 \text{дин} / \text{см} \cdot \text{дел}(6)$$

Тогда поверхностное натяжение

$$\sigma = kn = 0,22(\text{дин} / \text{см} \cdot \text{дел.})n(7), \quad \text{где}$$

n – число делений на весах.

Внешний вид весов Вильгельми-Ленгмюра изображен на рисунке 6.

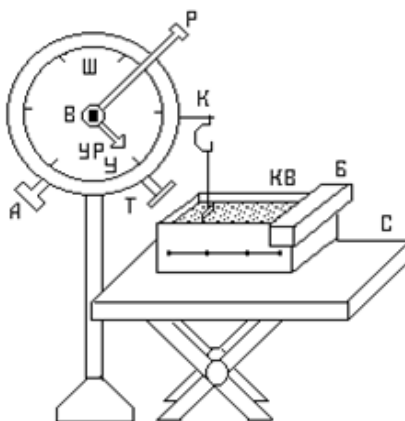


Рис. 6. Общий вид весов Вильгельми–Лэнгмюра

Вместо чашечки для наложения груза изображена пластинка П;

У – указатель веса, который можно переводить на различные участки шкалы при помощи рычага Р;

К – конец коромысла для подвешивания пластинки;

Ш – шкала весов; А – арретир, закрепляющий коромысло весов; Т – тарировочная головка, позволяющая устанавливать равновесие без нагрузки при указателе веса У на нулевом делении шкалы,

УР – указатель равновесия, расположенный на одной оси с коромыслом весов К.

В отсутствие нагрузки указатель веса У должен находиться в нулевом положении, а указатель равновесия УР должен быть совмещен с чертой, отмечающей положение равновесия.

Весы монтируют на штативе по горизонтальному уровню. Паррафинированную кювету с подвижным барьером помещают на подъемный столик С. Барьер Б устанавливают перед заполнением жидкостью в точке 100 % на шкале кюветы.

2. Приготовить экстракт из ткани легкого крысы или морской свинки. Для этого ткань заливают небольшим количеством физиологического раствора, растирают в ступке и фильтруют. Фильтрат выливают в кювету и разводят таким количеством физиологического раствора, чтобы подвижный барьер касался поверхности жидкости. Для формирования монослоя следует подождать 15-20 минут.

3. Измерить поверхностное натяжение, каждый раз сокращая площадь путем передвижения барьера на 10 % и принимая наибольшую площадь за 100 %. Последней точкой сжатия является площадь,

составляющая 20 % от исходной. Затем произвести растяжение моно-слоя до исходной площади.

Перед каждым измерением указатель веса (У) устанавливают на нуль рычагом (Р). Вращением тарировочной головки (Т) уравнивают стеклянную пластинку, добиваясь совмещения УР с чертой, отмечающей положение равновесия на шкале прибора.

С помощью подъемного столбика (С) кювету поднимают до соприкосновения нижнего края пластинки с поверхностью экстракта и образования мениска. Пластинка втягивается в жидкость.

Освобождают рычаг арретира А и перемещением рычага Р возвращают частично погрузившуюся пластинку в положение равновесия. Вырывать пластинку из жидкости не следует во избежание нарушения монослоя, потому что равновесие достигается перед самым отрывом.

Показания указателя весов У при каждом положении барьера Б занести в таблицу.

Задание 1

Измерить силу отрыва пластинки от поверхности монослоя легочного сурфактанта в делениях шкалы весов. Рассчитать для каждого измерения поверхностное натяжение и поверхностное давление по приведенным выше формулам и занести в таблицу.

Таблица 9

Поло- жение барье- ра, %	Сжатие			Растяжение		
	Показа- ние весов, дин	Поверхностное		Показа- ние весов, дин	Поверхностное	
		Натяжение, дин/см	Давление, дин/см		Натяжение, дин/см	Давление, дин/см
100						
90						
80						
70						
60						
50						
40						
30						
20						

Задание 2

Построить график зависимости поверхностного давления Р от положения барьера, т. е. от площади

Задание 3

Рассчитать индекс стабильности (ИС) монослоя.

Сделать выводы (наблюдается или нет характерная петля гистерезиса)

Примечание.

- 1. Прежде чем начать работать с экстрактом, проверить точность показаний весов по дистиллированной воде, поверхностное натяжение которой равно 72 дин/см.*
- 2. Перед опытом ополоснуть кювету дистиллированной водой, а пластинку – последовательно эфиром и дистиллированной водой.*

Вопросы для самоконтроля

1. Что представляет собой свободная поверхностная энергия?
2. Какими факторами обусловлена эластическая тяга легких?
3. Какую закономерность отражает уравнение Лапласа

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

Выберите один или несколько правильных ответов.

1. МОЛЕКУЛЫ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ЯВЛЯЮТСЯ
 - 1) гидрофобными
 - 2) гидрофильными
 - 3) амфифильными
 - 4) нерастворимыми в воде
2. ЗАКОН ЛАПЛАСА ОТРАЖАЕТ ЗАВИСИМОСТЬ МЕЖДУ
 - 1) коэффициентом поверхностного натяжения и радиусом кривизны поверхности
 - 2) поверхностным давлением и радиусом кривизны поверхности
 - 3) гидростатическим давлением и радиусом кривизны поверхности
 - 4) гидростатическим сопротивлением и гидростатическим давлением
3. ВОЗМОЖНОСТЬ ОБРАЗОВЫВАТЬ МОНОСЛОЙ НА ПОВЕРХНОСТИ ВОДЫ ОПРЕДЕЛЯЕТСЯ СВОЙСТВОМ СУРФАКТАНТА
 - 1) амфифильность
 - 2) гидрофобность

- 3) гидрофильность
- 4) растворимость в органических растворителях

4. СУРФАКТАНТ

- 1) обладает поверхностно-активными свойствами
- 2) образуется альвеоцитами
- 3) повышает поверхностное натяжение жидкости
- 4) препятствует спадению альвеол во время выдоха

5. НЕДОСТАТОК ВЫРАБОТКИ СУРФАКТАНТА

- 1) не изменяет функционирование дыхательной системы
- 2) снижает эластичность легких
- 3) влияет на эластическую тягу легких
- 4) повышает риск спадения альвеол во время вдоха

6. СУРФАКТАНТ ПРЕДСТАВЛЯЕТ СОБОЙ

- 1) совокупность липидов
- 2) индивидуальное вещество
- 3) липопротеидный комплекс
- 4) совокупность белков

7. ЗАВИСИМОСТЬ ПОВЕРХНОСТНОГО НАТЯЖЕНИЯ ВОДЫ В ПРИСУТСТВИИ СУРФАКТАНТА ОТ РАЗМЕРОВ ПОВЕРХНОСТИ МОНОСЛОЯ ИМЕЕТ ВИД

- 1) прямой
- 2) параболы
- 3) гиперболы
- 4) петли

8. ПРИ УВЕЛИЧЕНИИ ПЛОЩАДИ МОНОСЛОЯ ЛЕГОЧНОГО СУРФАКТАНТА

- 1) увеличивается его поверхностное натяжение
- 2) снижается его поверхностное давление
- 3) уменьшается его поверхностное натяжение
- 4) увеличивается его поверхностное давление

9. ИНДЕКС СТАБИЛЬНОСТИ МОНОСЛОЯ СУРФАКТАНТА ОПРЕДЕЛЯЕТ

- 1) степень упаковки молекул монослоя

- 2) способность формировать стабильную пленку на границе раздела фаз
- 3) энергию, расходуемую на сжатие-растяжение
- 4) микровязкость монослоя

10. ВЕСЫ ВИЛЬГЕЛЬМИ–ЛЕНГМЮРА ИСПОЛЬЗУЮТ ДЛЯ ИЗМЕРЕНИЯ

- 1) поверхностного натяжения монослоя сурфактанта
- 2) поверхностного натяжения воды
- 3) поверхностного давления монослоя сурфактанта
- 4) силы отрыва пластины от монослоя сурфактанта

СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ

Задача 1

К чему приведет разрыв монослоя, произошедший в процессе измерения его поверхностно-активных свойств, и как эти изменения компенсировать?

Задача 2

Как изменится зависимость поверхностного давления жидкости в отсутствие поверхностно-активного вещества?

Задача 3

Что произойдет с показателем индекса стабильности монослоя, если наблюдается снижение (повышение) его поверхностно-активных свойств?

Тема 11

ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

Цель занятия: Изучить влияние желчи на коэффициент поверхностного натяжения воды.

Приборы и оборудование: Установка Ребиндера, желчь, набор пробирок в штативе, пипетки мерные.

Вопросы для самоподготовки

1. Роль биологических ПАВ в живом организме.
2. Роль желчи в пищеварении.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Очень многие биологические соединения оказывают влияние на поверхностное натяжение, т. е. являются поверхностно-активными. Так, нормальное функционирование легочных альвеол обеспечивается в них наличием специальных соединений сурфактанта. Важную роль играют такие вещества в пищеварении. Например, способность желчи содействовать перевариванию жиров зависит не только от ее химического воздействия. Желчные кислоты по отношению к жирам являются поверхностно-активными: уменьшая поверхностное натяжение капель жира, они делают возможным раздробление их на значительно более мелкие. В результате чего поверхность соприкосновения ферментов с пищей возрастает во много раз и соответственно увеличивается скорость переваривания последней.

Для определения коэффициента поверхностного натяжения применяется метод, предложенный академиком П. А. Ребиндером. Он основан на измерении давления, необходимого для выдавливания пузырька воздуха из капилляра, погруженного в исследуемую жидкость. Установка Ребиндера включает стаканчик с исследуемой жидкостью, в которую погружен кончик капилляра. Капилляр через тройник соединен с колбой, закрытой пробкой с двумя отверстиями. В колбу может падать вода из поставленной выше банки. Скорость подачи воды регулируется винтовым зажимом. Давление воздуха в капилляре измеряется манометром, заполненным жидкостью с небольшой плотностью.

Хорошая работа установки в большой мере зависит от чистоты капилляра и герметичности закрытой колбы, поэтому плотность закупорки пробкой этой колбы необходимо постоянно проверять и устранять все нарушения герметичности.

Принцип метода состоит в следующем. Чтобы выдавить пузырек воздуха из капилляра, погруженного в жидкость, надо преодолеть поверхностное натяжение жидкости. Для этого необходимо избыточное (по сравнению с атмосферным) давление, определяемое по формуле Лапласа:

$$P = 2\sigma / r(1), \quad \text{где}$$

σ – коэффициент поверхностного натяжения;

r – радиус капилляра.

Но, с другой стороны,

$$P = \rho g(h_2 - h_1)(2), \quad \text{где}$$

ρ – плотность жидкости в манометре,

h_1 и h_2 – высоты уровней жидкостей по шкале манометра.

Сначала проводят опыт с жидкостью, для которой коэффициент поверхностного натяжения σ_0 известен (например, с дистиллированной водой, для которой при 20°C $\sigma_0=72$ дин/см).

Затем делают измерения с исследуемой жидкостью. Тогда:

$$\rho g(h_2 - h_1)_0 = 2\sigma_0 / r$$

$$\rho g(h_2 - h_1)_{жс} = 2\sigma_{жс} / r$$

Разделив одно равенство на другое, получим:

$$\sigma_{жс} / \sigma_0 = (h_2 - h_1)_{жс} / (h_2 - h_1)_0(3)$$

Таким образом, для определения коэффициента поверхностного натяжения достаточно измерить разность уровней в манометре в момент отрыва пузырька.

Метод Ребиндера сейчас широко применяется, так как при простоте выполнения он дает довольно высокую точность. Большим его достоинством является и то, что для измерения достаточно очень малого количества жидкости (вместо стаканчика можно взять каплю жидкости в часовом стекле).

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Ознакомившись с установкой, налить в стаканчик дистиллированную воду. Так как даже небольшие примеси влияют на поверхностное натяжение, очень важно, чтобы капилляр, стаканчик и остальная посуда были чистыми (ни в коем случае нельзя трогать кончик капилляра руками). Опустить капилляр так, чтобы его кончик коснулся поверхности жидкости в стакане. Погружать капилляр глубже не надо, чтобы не создать дополнительного давления жидкости в стакане. Открыть винтовой зажим, регулируя подачу воды из банки. Она должна течь не сплошной струей, а вытекать по каплям. При этом давление воздуха в колбе повышается, а из капилляра начинают выходить пузырьки. Скорость подачи воды надо отрегулировать так, чтобы пузырьки отрывались каждые 5–10 секунд. Добившись этого, измерить уровни в манометре h_2 и h_1 в момент отрыва пузырька. По мере повышения давления в колбе уровень в одной из трубок постоянно растет, а в другой – понижается. В момент отрыва пузырька происходит резкий скачок уровня. Следует отметить предельные значения уровней h_2 и h_1 , непосредственно предшествующие скачку.

Поскольку точная регистрация значений затруднительна, да и пузырьки бывают не абсолютно одинаковыми, надо обязательно проделать не менее 4–5 измерений и взять средние значения. По ним найти разность уровней (h_2-h_1). Результаты записать в таблицу 10.

Таблица 10

№	Вода		Вода с желчью													
			0,2 %		0,4 %		0,6 %		0,8 %		1 %		2 %		3 %	
	h_1	h_2	h_1	h_2	h_1	h_2	h_1	h_2	h_1	h_2	h_1	h_2	h_1	h_2	h_1	h_2
1																
2																
3																
4																
5																
Ср. знач.																
h_2-h_1																
σ	72 дин/см															

В другой стаканчик налить 0,2 % раствор желчи, опустить в него капилляр и повторить измерения так же, как и в первом случае. Но перед началом измерений обязательно надо промыть кончик капилляра исследуемым раствором; для этого погрузить капилляр на 3–4 мм и пропустить 5–6 пузырьков. Затем поднять капилляр, опустить его так, чтобы кончик лишь касался поверхности жидкости, и приступить к измерениям. Результаты записать в таблицу. Вылить раствор из стаканчика, налить 0,4 % раствор желчи, промыть капилляр и сделать измерения.

Задание 1

Приготовить растворы желчи концентраций, приведенных в таблице, исходя из соображений, что цельная желчь – 100 % раствор. Сначала развести исходный раствор в 10 раз (1 часть 100 % желчи и 9 частей воды).

Затем из 10 % раствора приготовить рабочие растворы согласно следующей прописи (табл. 11)

Таблица 11

№ р-ра	Рабочая концентрация желчи	Кол-во (мл) и % концентрация исходного раствора желчи	Количество воды, мл
1	3 %	3 мл 10 % желчи	7 мл воды
2	2 %	2 мл 10 % желчи	8 мл воды
3	1 %	1 мл 10 % желчи	9 мл воды
4	0,8 %	0,8 мл 1 % желчи	0,2 мл воды
5	0,6 %	0,6 мл 1 % желчи	0,4 мл воды
6	0,4 %	0,4 мл 1 % желчи	0,6 мл воды
7	0,2 %	0,2 мл 1 % желчи	0,8 мл воды

Задание 2

По очереди провести эксперимент со всеми растворами. Записать результаты, вычислить значения коэффициентов поверхностного натяжения. Полученные данные представить графически, отложив по оси абсцисс концентрацию желчи, а по оси ординат коэффициент поверхностного натяжения.

Для оценки погрешности выбрать одну из серий измерений и определить для нее ошибку по среднему квадратичному отклоне-

нию. Если была выбрана достаточно типичная серия, эту оценку ошибки можно приблизительно распространить на все результаты.

Вопросы для самоконтроля

1. Что является физической основой метода Ребиндера?
2. Какими свойствами обладают поверхностно-активные вещества?

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

Выберите один или несколько правильных ответов.

1. МОЛЕКУЛЫ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ЯВЛЯЮТСЯ
 - 1) гидрофобными
 - 2) гидрофильными
 - 3) амфифильными
 - 4) нерастворимыми в воде
2. ЗАКОН ЛАПЛАСА ЗАПИСЫВАЕТСЯ КАК
 - 1) $P=2\delta/r$
 - 2) $P=2r/\sigma$
 - 3) $P=2\tau/r$
 - 4) $P=2\tau h/r$
3. ВОЗМОЖНОСТЬ ПАВ ОБРАЗОВЫВАТЬ МОНОСЛОЙ ОПРЕДЕЛЯЕТСЯ ЕГО
 - 1) амфифильностью
 - 2) гидрофобностью
 - 3) гидрофильностью
 - 4) растворимостью в органических растворителях
4. ЖЕЛЧНЫЕ КИСЛОТЫ СНИЖАЮТ ПОВЕРХНОСТНОЕ НАТЯЖЕНИЕ, Т.К. ЯВЛЯЮТСЯ
 - 1) ферментами
 - 2) водорастворимыми веществами
 - 3) поверхностно-активными веществами
 - 4) производными белков
5. ЖЕЛЧНЫЕ КИСЛОТЫ ОБЕСПЕЧИВАЮТ ЭМУЛЬГАЦИЮ

- 1) липидов
 - 2) белков
 - 3) липопротеидного комплекса
 - 4) любых веществ
6. ЖЕЛЧЬ ПРЕДСТАВЛЯЕТ СОБОЙ СЛОЖНУЮ КОМПОЗИЦИЮ
- 1) липидов и белков
 - 2) белков
 - 3) желчных кислот и солей
 - 4) ферментов
7. КОЭФФИЦИЕНТ ПОВЕРХНОСТНОГО НАТЯЖЕНИЯ ВОДЫ В ПРИСУТСТВИИ ЖЕЛЧИ
- 1) всегда увеличивается
 - 2) всегда уменьшается
 - 3) не изменяется
 - 4) уменьшается только при высоких концентрациях
8. ПРИ УВЕЛИЧЕНИИ КОНЦЕНТРАЦИИ ЖЕЛЧНЫХ КИСЛОТ ПОВЕРХНОСТНОЕ НАТЯЖЕНИЕ ВОДЫ
- 1) растет
 - 2) падает
 - 3) остается неизменным
 - 4) зависит от температуры
9. ПРИНЦИП МЕТОДА РЕБИНДЕРА ОСНОВАН НА СРАВНЕНИИ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПОВЕРХНОСТНОГО НАТЯЖЕНИЯ РАСТВОРОВ ЖЕЛЧИ И
- 1) воды
 - 2) спирта
 - 3) жиров
 - 4) органических кислот
10. С ПОМОЩЬЮ УСТАНОВКИ РЕБИНДЕРА НЕПОСРЕДСТВЕННО ОЦЕНИВАЕТСЯ
- 1) коэффициент поверхностного натяжения жидкостей
 - 2) концентрация желчных кислот в растворе

- 3) разность уровней в манометре
- 4) диаметр капилляра

СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ

Задача 1

Можно ли на основании построенной по известным концентрациям желчи зависимости от коэффициента поверхностного натяжения определить концентрацию желчи в неизвестном растворе?

Задача 2

Почему первым из измерений силы выталкивания пузырька воздуха из исследуемого раствора следует пренебречь?

Задача 3

Какие причины могут лежать в основе отсутствия зависимости от коэффициента поверхностного натяжения раствора желчи от ее концентрации в воде?

Тема 12

ИССЛЕДОВАНИЕ ПОВЕРХНОСТНОГО НАТЯЖЕНИЯ РАЗЛИЧНЫХ ЖИДКОСТЕЙ МЕТОДОМ ОТРЫВА КОЛЬЦА

Цель занятия: Определить методом отрыва кольца коэффициент поверхностного натяжения воды, раствора Рингера, установить влияние ПАВ на поверхностное натяжение раствора Рингера.

Приборы и оборудование: Весы торсионные, подъемный столик, чашки Петри, металлическое кольцо, физиологический раствор, Раствор Рингера, 0,1 % раствор олеата натрия, дистиллированная вода.

Вопросы для самоподготовки

1. Силы поверхностного натяжения в жидкостях.
2. Факторы, влияющие на поверхностное натяжение.
3. Практическое значение исследования поверхностного натяжения биологических жидкостей.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Каждая молекула, находясь в растворе, подвергается силам молекулярного взаимодействия на расстояниях, не превышающих 10^{-8} м. На поверхности раздела «жидкость – воздух» силы межмолекулярного притяжения и отталкивания не уравниваются, поэтому появляется избыток свободной энергии, который стремится уменьшить до минимума поверхность раздела. С позиций термодинамики изменение свободной энергии Гиббса (изобарно-изотермический потенциал) (ΔG), затраченное на изменение единицы площади поверхности (ΔS), называется коэффициентом поверхностного натяжения (σ):

$$\sigma = \Delta G / \Delta S$$

Коэффициент поверхностного натяжения измеряется в Дж/м² или н/м. Поверхностное натяжение уменьшается с ростом температуры и становится равным 0 при критической температуре. Поверхностное натяжение воды при $T=291$ К равно $72,75 \cdot 10^{-3}$ Н/м.

Поверхностное натяжение растворов отличается от поверхностного натяжения чистых растворителей. Например, сахароза повышает поверхностное натяжение воды, а соли снижают.

Вещества, которые в небольших количествах значительно снижают поверхностное натяжение, называют поверхностно-активными. Они обладают способностью адсорбироваться на поверхности воды, образуя мономолекулярные слои. Это обусловлено наличием в них гидрофильных и гидрофобных групп.

Одной из первых моделей мембран, предложенной Гортером и Гренделем, был билипидный слой. Однако оказалось, что поверхностное натяжение клеточных мембран гораздо меньше, чем водно-липидных систем. Показано, что адсорбция белка на поверхности липидного слоя существенно снижает поверхностное натяжение и приближает его к значениям, характерным для клеток.

Измерение поверхностного натяжения сыворотки, плазмы крови, ликвора может иметь значение в клинической диагностике.

Измерение поверхностного натяжения используется при изучении действия поверхностно-активных веществ на мембраны клеток, на состояние биологически важных жидкостей.

В настоящей работе коэффициент поверхностного натяжения жидкостей определяется методом отрыва кольца.

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

1. Установить торсионные весы строго горизонтально поверхности стола с помощью опорных винтов, чтобы пузырек уровня был отцентрован.
2. Вместо чашечки на крючок торсионных весов вешают металлическое кольцо, предварительно прокаленное на спиртовке.
3. Рычаг весов переводят в положение «открыто». Отсчетную стрелку устанавливают на 0, контрольную стрелку совмещают с контрольным штрихом.
4. На подъемный столик помещают чашку Петри с дистиллированной водой и с помощью винта поднимают столик до тех пор, пока кольцо не коснется поверхности воды (не следует затапливать кольцо).
5. Отсчетную стрелку вращать до тех пор, пока кольцо не оторвется от поверхности жидкости. Следует внимательно наблюдать за кольцом, и движение отсчетной стрелки прекращать именно в момент отрыва.
6. Полученный результат (Р) занести в протокол.
7. Рассчитать коэффициент поверхностного натяжения по формуле:

$$\sigma = \frac{P \cdot 981 \cdot 10^{-5}}{2\pi r}, \quad \text{где}$$

σ – коэффициент поверхностного натяжения;

P – сила отрыва кольца (г), r – радиус кольца (м).

8. Определить коэффициент различных жидкостей по формуле:

$$\sigma_x = \sigma_{H_2O} Q$$

$$Q = Q_x K - K + 1$$

$$Q = \frac{P_x}{P_{H_2O}}, \quad \text{где}$$

Q – относительное поверхностное натяжение данной жидкости;

Q_x – отношение силы отрыва кольца от данной жидкости к силе отрыва кольца от воды;

P_x – сила отрыва кольца от данной жидкости;

P_{H_2O} – сила отрыва кольца от данной жидкости.

9. K – эмпирическая константа, определяемая для каждого кольца экспериментально. Определить K . Для этого необходимо измерить силу отрыва кольца от воды (см. пп. 1-7) P_{H_2O} и любой другой жидкости P_0 , для которой известен коэффициент поверхностного натяжения σ_0 . Чаще всего для этой цели используют 96⁰ этиловый спирт; σ_0 этилового спирта равен $22,27 \cdot 10^{-3}$ н/м.

$$K = \frac{\frac{\sigma_0}{P_0} - 1}{\frac{\sigma_{H_2O}}{P_{H_2O}} - 1}$$

Задание 1. Методом, описанным выше определить константу поверхностного натяжения воды и константу кольца.

Задание 2. Определить влияние поверхностно-активных веществ на поверхностное натяжение воды.

К воде, налитой в чашку Петри, добавить одну каплю 0,1 % олеата натрия и определить силу отрыва сразу же после добавления, через 1, 5, 10 и 15 минут. Рассчитать коэффициенты поверхностного натяжения и построить график зависимости коэффициента поверхностного натяжения от времени.

Вопросы для самоконтроля

1. В чем состоит принцип использованного в работе метода?
2. Какую роль играют силы поверхностного натяжения в биосистемах?

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

Выберите один или несколько правильных ответов.

1. МОЛЕКУЛА, НАХОДЯСЬ В РАСТВОРЕ, ПОДВЕРГАЕТСЯ СИЛАМ МОЛЕКУЛЯРНОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ НА РАССТОЯНИЯХ, НЕ ПРЕВЫШАЮЩИХ
 - 1) 10^8 м
 - 2) 10^{-18} м
 - 3) 10^{-8} м
 - 4) 10^{-3} м
 - 5) 10 нм
2. ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА СИЛУ ПОВЕРХНОСТНОГО НАТЯЖЕНИЯ ЖИДКОСТИ
 - 1) усиливают
 - 2) уменьшают
 - 3) не оказывают влияния
 - 4) инвертируют
3. МЕТАЛЛИЧЕСКОЕ КОЛЬЦО, ОКАЗАВШИСЬ НА ПОВЕРХНОСТИ ЖИДКОСТИ, СИЛАМИ ПОВЕРХНОСТНОГО НАТЯЖЕНИЯ
 - 1) выталкивается из жидкости
 - 2) притягивается к поверхности жидкости
 - 3) не взаимодействует с жидкостью
 - 4) растворяется в жидкости
4. ПОВЕРХНОСТНОЕ НАТЯЖЕНИЕ КЛЕТОЧНЫХ МЕМБРАН ПО ОТНОШЕНИЮ К ВОДНО-ЛИПИДНЫМ СИСТЕМАМ
 - 1) одинаковое
 - 2) гораздо меньше
 - 3) гораздо больше
 - 4) несколько больше

5. ОДНУ ИЗ ПЕРВЫХ МОДЕЛЕЙ МЕМБРАН, ПРЕДЛОЖИЛИ
- 1) Гортер и Грендель
 - 2) Нернст и Хаксли
 - 3) Ломоносов
 - 4) Робертсон
6. ПОКАЗАНО, ЧТО АДСОРБЦИЯ БЕЛКА НА ПОВЕРХНОСТИ ЛИПИДНОГО СЛОЯ ПОВЕРХНОСТНОЕ НАТЯЖЕНИЕ
- 1) удваивает
 - 2) не меняет
 - 3) сильно увеличивает
 - 4) существенно снижает
7. ПОВЕРХНОСТНОЕ НАТЯЖЕНИЕ С РОСТОМ ТЕМПЕРАТУРЫ
- 1) уменьшается
 - 2) увеличивается
 - 3) не зависит от температуры
 - 4) становится равным бесконечности
8. ИЗБЫТОК СВОБОДНОЙ ЭНЕРГИИ ПОВЕРХНОСТЬ РАЗДЕЛА СТРЕМИТСЯ
- 1) увеличить до максимума
 - 2) увеличить вдвое
 - 3) не влияет на поверхность
 - 4) уменьшить до минимума
9. ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА ОБЛАДАЮТ СПОСОБНОСТЬЮ
- 1) растворяться в жидкости
 - 2) не взаимодействовать с жидкостью
 - 3) отталкиваться от поверхности
 - 4) адсорбироваться на поверхности воды, образуя мономолекулярные слои

СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ

Задача 1

Как изменится поверхностное натяжение крови при увеличении концентрации глюкозы?

Задача 2

Определите поверхностное натяжение жидкости, если радиус кольца составляет 2 см, а сила отрыва кольца от поверхности равна 0,0240 Н.

Задача 3

Определите относительное поверхностное натяжение крови если сила отрыва кольца от крови составляет 0,065Н/м, а сила отрыва кольца от поверхности чистой воды – 0,072 Н/м.

Тема 13

БУФЕРНАЯ ЁМКОСТЬ КОМПОНЕНТОВ КРОВИ

Цель занятия: Определить буферную ёмкость гемолизата эритроцитов.

Приборы и оборудование: стандартный буферный раствор, свежая кровь, 0,1 н КОН, 0,1 НСl, 150 мМ NaCl, мерные пипетки с ценой деления 0,05–0,1 мл, рН-метр, центрифуга.

Вопросы для самоподготовки

1. Буферные системы крови.
2. Значение рН в биологических системах.
3. Понятия ацидоза и алкалоза.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

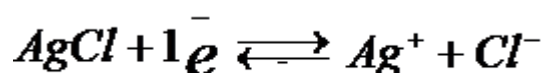
Определение рН биологических жидкостей необходимо в связи с тем, что многие биохимические процессы зависят от степени ионизации молекул, которые принимают в них участие. К таким процессам относятся ферментативные реакции, перенос кислорода гемоглобином, конформационные переходы белков и других биомакромолекул, поведение больших и малых молекул при электрофоретическом и хроматографическом разделении.

Принцип метода рН-метрии

Определение концентрации ионов водорода часто производят методом рН-метрии, который основан на измерении величины электродного потенциала.

Основной частью рН-метров является гальваническая цепь, собранная из электродов сравнения (каломельный, хлорсеребряный и др.) и индикаторных электродов. Последние используются для собственно определения активности потенциалопределяющих ионов, входящих в состав их электродного раствора.

Равновесный процесс в электроде сравнения выглядит следующим образом (для хлорсеребряного электрода):



Металл (Ag) погружен в трудно растворимую соль (AgCl). При добавлении хорошо растворимого электролита с общим анионом (Cl⁻) активность ионов хлора будет определять электродный потенциал. Увеличение их активности способствует снижению положительного потенциала электрода. В качестве индикаторного электрода используется стеклянный электрод, имеющий на конце шарик из специального электропроводного стекла (для Na⁺ и Li⁺). Внутри электрода находится электролит, представленный раствором соляной кислоты (0,1 н), и токоотвод – серебряный стержень, покрытый хлоридом серебра. В такой системе устанавливаются две разности потенциалов:

- 1) характерная для хлорсеребряного электрода (Ag/Ag⁺, Cl/Cl⁻);
- 2) на границе стеклянной мембраны и внутренним стандартным раствором.

При помещении стеклянного электрода в раствор с неизвестным рН возникает разница потенциалов на границе «стекло – внешний раствор». Это обусловлено активным вытеснением ионов щелочных металлов ионами H⁺. При достижении равновесия ионы H⁺ и Na⁺ распределяются между стеклом и раствором так, что поверхности фаз приобретают противоположные заряды. Этот двойной электрический слой служит причиной возникновения разности потенциалов, зависящей от концентрации ионов водорода.

Включенная в гальваническую цепь с электродом сравнения, эта разность потенциалов может быть измерена потенциометрическим способом, т. е. рН-метром.

Буферная емкость растворов

Буферные растворы способны сохранять постоянство рН при разведении и добавлении сильной кислоты или сильного основания. Буферные системы состоят из слабой кислоты и ее соли, образованной сильным основанием. Например, карбонатный буфер состоит из H₂CO₃ и NaHCO₃. Способность растворов противостоять изменениям рН называется буферным действием.

Мерой буферного действия растворов является их буферная емкость. Она характеризуется тем количеством кислоты или основания (в г-экв), которое нужно добавить к 1 л раствора, чтобы изменить его рН на 1 при условии, что буферное действие остается неизменным.

При добавлении кислоты рН уменьшается, и буферная емкость имеет отрицательное значение; при добавлении основания рН увеличивается, и буферная емкость имеет положительное значение.

Буферную емкость (В) определяют по кривой титрования, которая описывает зависимость рН раствора от количества добавляемой кислоты или щелочи. Буферная емкость рассчитывается по формуле:

$$B = \frac{v \cdot N \cdot 1000}{V(pH_2 - pH_1)}, \quad \text{где}$$

v – количество кислоты, пошедшей на титрование раствора от pH_1 до pH_2 ;

V – объем исследуемого раствора;

pH_1 – начальное значение рН раствора;

pH_2 – конечное значение рН раствора;

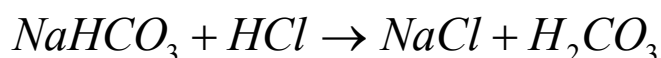
N – нормальность титрующего раствора.

Буферные системы крови. Важными буферными системами организма являются бикарбонатная, фосфатная, белковая и гемоглобиновая.

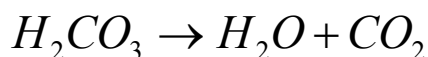
Бикарбонатный буфер состоит из H_2CO_3 и $NaHCO_3$, фосфатный буфер – из NaH_2PO_4 и Na_2HPO_4 . Белковый или гемоглобиновый – из белка или гемоглобина как слабых кислот и их натриевых или калиевых солей. Каждый буфер характеризуется определенным значением рН, которое он стремится сохранить. Механизм действия буферных систем крови состоит в следующем.

Бикарбонатный буфер

Известно, что в плазме крови и эритроцитах содержится свободная углекислота, а также ее соли: в плазме $NaHCO_3$, а в эритроцитах $KHCO_3$, количество которых в 20 раз выше, чем концентрация углекислоты. При увеличении в крови концентрации ионов водорода часть бикарбонатов тратится на их нейтрализацию с образованием угольной кислоты:

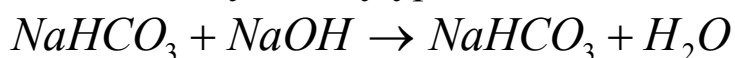


Образовавшийся избыток угольной кислоты легко диссоциирует на воду и углекислый газ:



Повышенная концентрация углекислого газа действует раздражающе на соответствующие рецепторы в сонной артерии, что, в свою очередь, раздражает дыхательный центр головного мозга. Усиливается вентиляция легких и избыточное количество CO_2 выводится легкими, а $NaCl$ – почками. В результате изменения рН не происходит.

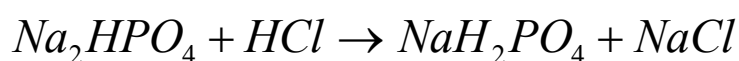
В случае увеличения в крови щелочных продуктов (обозначим их как NaOH) механизм действия бикарбонатной буферной системы будет осуществляться по следующему уравнению:



Избыток образовавшегося бикарбоната выводится почками или связывается с белками.

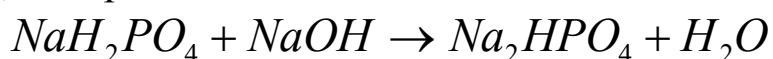
Фосфатный буфер

Фосфатный буфер состоит из NaH_2PO_4 и Na_2HPO_4 . NaH_2PO_4 обладает свойствами слабой кислоты, а Na_2HPO_4 – слабой щелочи. При избытке в тканях ионов водорода (обозначим их как HCl) происходит их нейтрализация:



Образовавшийся избыток солей выводится из организма почками.

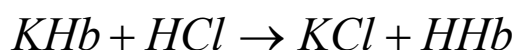
При избытке в тканях щелочных продуктов увеличивается продукция Na_2HPO_4 , который также выводится почками.



Таким образом, значение pH среды не меняется.

Гемоглобиновая буферная система

Буферные свойства этой системы основаны на взаимодействии кислых продуктов с калиевой солью гемоглобина с образованием эквивалентных количеств калиевой соли соответствующей кислоты и свободного гемоглобина:



Таким образом, буферные системы крови имеют большое значение в поддержании постоянной реакции среды.

В клинике часто используется понятие «щелочной резерв крови», под которым понимают все факторы, обеспечивающие нейтрализацию кислот, образующихся в ходе обмена веществ.

Ацидоз – состояние, при котором снижен щелочной резерв крови. Компенсированный ацидоз определяется как снижение щелочного резерва крови, при котором не происходит изменений pH. Некомпенсированный ацидоз характеризуется изменением реакции крови в кислую сторону. Алкалоз – состояние, при котором щелочные резервы крови значительно повышены. Наблюдается при «горной болезни» и др.

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Последовательность операций при работе на рН-метре ЛМП-60 М

1. Переключатель рода работ поставить в положение «0».
2. Включить прибор в электросеть.
3. После прогрева прибора (15 минут) перевести переключатель в положение, отвечающее необходимому измерению. Установить стрелку прибора на начальную (-2рН) отметку верхней шкалы.
4. Настроить прибор по стандартному буферному раствору. Для этого электроды поместить в стандартный раствор 1,68 рН. Переключатель границ измерений установить в положение «-2 – 2рН». Показатель температурной компенсации установить на значение буферного раствора (при ручной температурной компенсации). Удостовериться, что в нулевом положении переключателя рода работ положение стрелки отвечает начальной отметке верхней шкалы. При необходимости установить ее на начальную отметку ручкой «Начало шкалы». Перевести переключатель рода работ в положение «рН». Ручкой «Настройка по буферу» установить стрелку на значение 1,68 рН по верхней шкале. Затянуть ручку цанговым зажимом. После этого прибор готов к измерению.

Задание 1

1. Свежую крысиную кровь центрифугировать при 3000 об/мин, 5 минут, плазму удалить, осадок эритроцитов 1 раз промыть 150 мМ NaCl при тех же условиях центрифугирования.
2. Полученный осадок гемолизировать, добавив дистиллированную воду в соотношении 1:3.
3. Измерить объем полученного гемолизата, стаканчик с гемолизатом поместить на магнитную мешалку и измерить рН.
4. Довести рН с помощью щелочи до 11 и протитровать кислотой до значения 3. Кислоту добавлять маленькими порциями, чтобы значение рН менялось не более, чем на 0,1–0,2 ед. В таблице отмечать расход титранта и изменения рН.
5. Построить кривую титрования. По оси X отложить объемы добавленного раствора соляной кислоты, по оси У – значения рН.
6. Определить буферную емкость гемолизата по приведенной выше формуле.

Вопросы для самоконтроля

1. В чем состоит принцип метода потенциометрического титрования?

2. Каков механизм действия буферных систем крови?

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

Выберите один или несколько правильных ответов.

1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ИОНОВ ВОДОРОДА ЧАСТО ПРОИЗВОДЯТ МЕТОДОМ
 - 1) кондуктометрии
 - 2) колориметрии
 - 3) рН-метрии
 - 4) спектрометрии

2. ОСНОВНОЙ ЧАСТЬЮ РН-МЕТРОВ ЯВЛЯЕТСЯ ГАЛЬВАНИЧЕСКАЯ ЦЕПЬ, СОБРАННАЯ ИЗ ЭЛЕКТРОДОВ СРАВНЕНИЯ
 - 1) графитовых
 - 2) хлорсеребряных
 - 3) каломельных
 - 4) медных
 - 5) цинковых

3. ПРИЧИНОЙ ВОЗНИКНОВЕНИЯ РАЗНОСТИ ПОТЕНЦИАЛОВ, ЗАВИСЯЩЕЙ ОТ КОНЦЕНТРАЦИИ ИОНОВ ВОДОРОДА, СЛУЖИТ
 - 1) одинарный электрический слой
 - 2) буферная емкость электродов
 - 3) двойной электрический слой
 - 4) разная растворимость ионов водорода в электроде и измеряемом растворе

4. БУФЕРНАЯ ЕМКОСТЬ КРОВИ ОПРЕДЕЛЯЕТСЯ ЕЕ КОМПОНЕНТАМИ
 - 1) гемоглобином
 - 2) хлоридом натрия
 - 3) гидрокарбонатами
 - 4) кислородом
 - 5) водой

5. БУФЕРНАЯ ЕМКОСТЬ ОБЕСПЕЧИВАЕТ
 - 1) неизменность давления раствора
 - 2) постоянство температуры крови

- 3) постоянство рН при разведении и добавлении сильной кислоты или сильного основания
 - 4) мягкость при столкновении эритроцитов
6. СПОСОБНОСТЬ РАСТВОРОВ ПРОТИВОСТОЯТЬ ИЗМЕНЕНИЯМ РН НАЗЫВАЕТСЯ
- 1) буферным действием
 - 2) осмолярностью
 - 3) основностью
 - 4) кислотностью
7. БУФЕРНУЮ ЕМКОСТЬ ОПРЕДЕЛЯЮТ
- 1) кислотностью раствора
 - 2) основностью раствора
 - 3) нейтральностью раствора
 - 4) по кривой титрования
8. ВАЖНЕЙШИМИ БУФЕРНЫМИ СИСТЕМАМИ ОРГАНИЗМА ЯВЛЯЮТСЯ
- 1) бикарбонатная
 - 2) липопротеидная
 - 3) гемоглобиновая
 - 4) белковая
 - 5) сульфатная
 - 6) фосфатная
 - 7) хлорводородная
9. «ЩЕЛОЧНОЙ РЕЗЕРВ КРОВИ» – ЭТО ВСЕ ФАКТОРЫ, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИЕ
- 1) образование щелочи в плазме крови
 - 2) ацидоз
 - 3) алкалоз
 - 4) нейтрализацию кислот, образующихся в ходе обмена веществ
10. АЦИДОЗ – СОСТОЯНИЕ, ПРИ КОТОРОМ
- 1) снижен щелочной резерв крови
 - 2) повышен щелочной резерв крови
 - 3) кровь имеет нейтральную рН

4) вязкость крови снижена

СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ

Задача 1

Как изменится буферная емкость крови при добавлении к ней бикарбоната натрия?

Задача 2

Как будет изменяться рН крови при добавлении к ней кислоты по сравнению с физраствором? Почему?

Задача 3

К 100 мл крови с рН 7,40 добавили 10 мл 0,1 н раствора NaOH; рН выросла до значений 7,48. Определите буферную емкость крови.

Тема 14

ИССЛЕДОВАНИЕ ОСМОТИЧЕСКОГО ГЕМОЛИЗА ЭРИТРОЦИТОВ

Цель занятия: Исследовать резистентность эритроцитов к гипоосмотическим растворам хлорида натрия.

Приборы и оборудование: Свежая кровь, центрифуга, 10 % раствор NaCl, микроколориметр МКМФ-02.

Вопросы для самоподготовки

1. Строение цитоскелета эритроцитов и его роль в функционировании клеток.

2. Осмотическая устойчивость эритроцитов и факторы, ее определяющие.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАТЬ

Эритроциты являются удобной моделью для изучения разнообразных свойств биологических мембран и их функций. Это связано с тем, что красные кровяные тельца не имеют внутриклеточных мембран, легко доступны и в соответствующих условиях долго сохраняют жизнеспособность. Все биомембраны обладают механическими свойствами. Сила, достаточная для разрушения мембраны на участке в 1 мкм^2 , оценивается в 10^{-11} Н . Основной вклад в механическую прочность клеточной мембраны вносят белки, о чем свидетельствует сопоставление механических свойств липидного бислоя и нативной мембраны. Так, модуль упругости плазмолеммы эритроцитов на 1–2 порядка больше, чем у искусственной липидной мембраны. Значительный вклад в повышение упругости и прочности эритроцитарной мембраны вносят не только белки, встроенные в липидный бислой, но и белки цитоскелета.

Мембрана эритроцитов считается одной из наиболее простых мембранных систем, но и в ней присутствуют элементы мозаичной и бутербродной моделей. Плазмолемма эритроцита в высшей степени асимметрична, что проявляется в различном составе молекулярных компонентов ее наружной и внутренней сторон, а также в их неодинаковой толщине. Общая площадь мембраны эритроцита составляет $140\text{--}150 \text{ мкм}^2$, а масса – $(1,1\text{--}1,2) \cdot 10^{-12} \text{ г}$. В мембране эритроцитов в среднем содержится 50 % белков, 40 % липидов и 10 % углеводов.

Среди липидов эритроцитарной мембраны следует отметить холестерин, фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин, сфингомиелин, фосфатидилсерин и фосфатидилинозит. Холестерин распределен более или менее равномерно между слоями бислоя, в то время как фосфатидилхолин и сфингомиелин преобладают в наружном слое липидов, а фосфатидилсерин, фосфатидилэтаноламин и фосфатидилинозит – во внутреннем. Интегральными белками эритроцитарной мембраны являются гликофорин и белок полосы 3.

Важную роль в поддержании формы и высокой деформируемости эритроцитов играют белки мембранного каркаса: спектрин, актин, анкирин, белки полос 4.1 и 4.9. Белок полосы 4.2, аддуцин, тропомиозин и тропомодулин условно относят к мембранному каркасу, поскольку их функции изучены недостаточно. Спектрин – основной количественно преобладающий белок мембранного каркаса эритроцита, составляет 76 %. Образуя с актином белковую сеть на цитоплазматической стороне мембраны, спектрин участвует в поддержании интегративной целостности мембран и в обеспечении высокой деформируемости эритроцитов. При удалении спектрина из мембран клетки не в состоянии сохранять свою целостность и распадаются на везикулы размером около 1 мкм. Спектрин и актин являются актомиозиноподобными сократительными белками. Они выполняют как цитоскелетную, так и цитокинетическую функции. Анкирин обеспечивает связь спектрина с цитоплазматическим доменом интегрального белка полосы 3 и играет роль своеобразного якоря, фиксирующего белковую сеть цитоскелета к липидному матриксу мембраны. Белок полосы 4.1 связан со спектрином, актином, интегральными белками – полосы 3 и гликофоринами. Белок полосы 4.9 имеет не менее двух мест связывания для актина, которые задействуются, когда белок 4.9 присутствует в комплексе «спектрин – актин – белок 4.1». Белок полосы 4.2 связан с цитоплазматическим доменом анионного обменника, анкирином и белком полосы 4.1. Он необходим для стабилизации структуры мембраны. Аддуцин связывается со спектрин-актиновым комплексом и обеспечивает взаимодействие спектрина с актином. Тропомиозин связывается с актиновыми филаментами и предохраняет их от механических повреждений при сдвиговой деформации мембраны эритроцита, а также от воздействия актин-деполимеризующих белков. Тропомодулин связывается с концами тропомиозиновых молекул и, возможно, регулирует их взаимодействие с актином.

В целом белок-белковые взаимодействия являются критическим фактором, определяющим форму эритроцитов и механическую стабильность мембраны. Кроме того, в обеспечении стабильности участвует и взаимодействие белков мембранного каркаса с липидным матриксом мембраны. Свойство эритроцитов противостоять разрушительным воздействиям называют резистентностью. Резистентность или устойчивость эритроцитов можно исследовать по отношению к различным факторам: осмотическим, химическим, температурным и др. В настоящей работе будет изучена осмотическая резистентность эритроцитов.

Сущность метода заключается в исследовании устойчивости эритроцитов по отношению к гипотоническим растворам хлорида натрия. В норме эритроциты человека выдерживают снижение концентрации NaCl до 0,48–0,44 %. При концентрации NaCl ниже указанной гемолизируют первые наименее стойкие эритроциты (минимальная резистентность, верхняя граница осмотической резистентности). При дальнейшем уменьшении концентрации NaCl начинают разрушаться и более стойкие эритроциты. При концентрации NaCl от 0,32 до 0,38 % подвергаются гемолизу практически все эритроциты (максимальная резистентность, нижняя граница осмотической резистентности). Интервал между верхней и нижней границами называют амплитудой резистентности, а интервал между изотоническим пунктом (0,85 % NaCl) и верхней границей – зоной прочности.

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Основным раствором является 10 % раствор NaCl. Из основного раствора, предварительно разведенного в соотношении 1:10, приготовить следующие растворы: 0,85 %, 0,75 %, 0,65 %, 0,50 %, 0,40 %, 0,30 %, 0,20 %, 0,10 %.

В серию пробирок поместить по 5 мл каждого раствора и добавить по 0,05 мл гепаринизированной крови. Перемешать и оставить на 30 минут при комнатной температуре.

Центрифугировать полученные взвеси в течение 5 минут при 2000 об/мин. Перед центрифугированием пробирки с кровью необходимо попарно уравновесить с помощью центрифужных весов.

Определить оптическую плотность надосадочной жидкости из всех пробирок с помощью микроколориметра МКМФ-02. Компенса-

торной жидкостью служит надосадочная жидкость из пробирки с концентрацией NaCl 0,85 %.

Инструкция по определению концентрации гемоглобина на микроколориметре мкмф-02

1. Установить в соответствующие ниши прибора заглушку и рабочий светофильтр «540».

2. Включить прибор в сеть кнопкой «Сеть» на задней панели.

3. Нажать кнопку «Пуск» и кнопку «Ш(0)» на передней панели.

На цифровом табло появится символ «0» и числовое значение в пределах от 0,05 до 0,300.

4. Дать прибору прогреться в течение 30 минут.

5. Вновь нажать кнопку «Ш(0)». Значение на табло может измениться, но будет находиться в пределах от 0,05 до 0,300 (допускается значение от 0,001 до 0,600).

6. Вынуть заглушку и проверить работоспособность прибора следующим образом:

Нажать кнопку «Пуск», нажать кнопку «К(1)». На табло загорится символ «1».

Нажать кнопку «τ(2)». На табло загорится символ «2» и значение $100 \pm 1,00$.

Нажать кнопку «D(5)». На табло загорится символ «5» и значение $0,000 \pm 0,002$. Прибор готов к работе.

7. Установить в кюветное отделение кювету с трансформирующим раствором. Нажать кнопку «К(1)». На табло загорится символ «1». Нажать кнопку «D(5)». На табло должно быть значение от $0,000 \pm 0,002$.

8. Установить вместо кюветы с трансформирующим раствором кювету с известной концентрацией гемоглобина. Нажать кнопку «D(5)». Записать показания, появившиеся на табло. Рассчитать калибровочный коэффициент по формуле: $b = 10^3 \times D/C$, где
С – известная концентрация гемоглобина в г/л;
D – значение оптической плотности на цифровом табло.

Например, $D = 0,375$, $C = 150$ г/л, тогда $b = 2,5$.

9. Ввести калибровочный коэффициент в память прибора, для этого:

Нажать кнопку «b». На табло высветится символ «b» и 1,000.

Нажать кнопку «Сбр». Табло погаснет.

Набрать на наборном цифровом клавишном поле значение, рассчитанное по формуле (например, 2,5). Нажать клавишу «УТВ».

10. Повторить п. 7, а затем установить в кюветное отделение кювету с неизвестной концентрацией гемоглобина. Нажать клавишу «С(4)». На табло высветится символ «4» и значение, в котором три цифры после запятой означают величину концентрации гемоглобина в г/л (например, значение на табло 0,126 означает концентрацию гемоглобина 126 г/л, а, 0,095 – 95 г/л).

Примечание. Для уменьшения ошибки в определении калибровочного коэффициента рекомендуется приготовить три (или пять) концентраций гемоглобина и повторить п. 8, после чего рассчитать среднее значение калибровочного коэффициента и занести его в память прибора.

11. Далее, устанавливая в кюветное отделение кюветы с исследуемыми пробами, нажимать клавишу «С(4)» и списывать с табло значения концентрации гемоглобина.

Внимание! После окончания работы на приборе и выключения его из сети коэффициент b автоматически стирается из памяти и, чтобы продолжить работу (например, на следующий день), необходимо заново, повторив действия п. 9, ввести тот же коэффициент b . Перерасчет коэффициента b необходимо производить только при переходе на новую партию реактивов.

Оптическая плотность надосадочной жидкости из раствора с концентрацией 0,1 % соответствует 100 % гемолизу. Рассчитать процент гемолиза в каждой пробирке. Результаты отобразить графически. По оси абсцисс отложить значения концентрации растворов NaCl, по оси ординат – процент гемолиза. Определить амплитуду резистентности и зону прочности эритроцитов. Полученные данные занести в таблицу.

Таблица 12

C, NaCl	0,85 %	0,75 %	0,65 %	0,50 %	0,40 %	0,30 %	0,20 %	0,10 %
D								
% гемолиза								

Вопросы для самоконтроля

1. Что такое резистентность эритроцитов?

2. Какие факторы определяют резистентность эритроцитов?
3. В чем состоит принцип используемого метода?
4. Каковы параметры, характеризующие осмотическую резистентность эритроцитов?

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

Выберите один или несколько правильных ответов.

1. ОСНОВНОЙ ВКЛАД В МЕХАНИЧЕСКУЮ ПРОЧНОСТЬ КЛЕТОЧНОЙ МЕМБРАНЫ ВНОСЯТ

- 1) липиды
- 2) белки
- 3) углеводы
- 4) гликолипиды

2. ЭРИТРОЦИТЫ ЯВЛЯЮТСЯ УДОБНОЙ МОДЕЛЬЮ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ РАЗНООБРАЗНЫХ СВОЙСТВ БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕМБРАН И ИХ ФУНКЦИЙ ПОТОМУ, ЧТО

- 1) не имеют внутриклеточных мембран
- 2) имеют округлую форму
- 3) имеют клеточную стенку
- 4) переносят кислород

3. БЕЛКИ ЦИТОСКЕЛЕТА ЭРИТРОЦИТОВ ОБЕСПЕЧИВАЮТ

- 1) амфифильность липидов мембраны
- 2) повышенную упругость мембраны
- 3) жидкокристаллическое строение мембраны
- 4) повышенную деформируемость мембраны

4. ПЛАЗМАЛЕММА ЭРИТРОЦИТА

- 1) асимметрична
- 2) симметрична
- 3) равномерна по толщине
- 4) толще мембран других клеток

5. ХОЛЕСТЕРИН В МЕМБРАНЕ ЭРИТРОЦИТОВ

- 1) отсутствует
- 2) распределен неравномерно

- 3) распределен равномерно
- 4) обеспечивает повышенную деформируемость
- 5) обеспечивает повышение жесткости мембраны

6. В ПОДДЕРЖАНИИ ФОРМЫ И ВЫСОКОЙ ДЕФОРМИРУЕМОСТИ ЭРИТРОЦИТОВ ВАЖНУЮ РОЛЬ ИГРАЮТ

- 1) спектрин
- 2) альбумин
- 3) актин
- 4) миозин
- 5) анкирин
- 8) гемоглобин

7. СПЕКТРИН И АКТИН ЯВЛЯЮТСЯ

- 1) белками-ферментами
- 2) актомиозиноподобными сократительными белками
- 3) липидами мембран
- 4) полисахаридами

8. ФОРМУ ЭРИТРОЦИТОВ И МЕХАНИЧЕСКУЮ СТАБИЛЬНОСТЬ МЕМБРАНЫ ОПРЕДЕЛЯЮТ:

- 1) белок-белковые взаимодействия
- 2) липид-липидные взаимодействия
- 3) электростатические взаимодействия
- 4) гидрофобные взаимодействия
- 5) гидрофильные взаимодействия

9. В НОРМЕ ЭРИТРОЦИТЫ ЧЕЛОВЕКА ВЫДЕРЖИВАЮТ СНИЖЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ NaCl ДО

- 1) 0 %
- 2) 100 %
- 3) 0,48-0,44 %
- 4) 5,5-4,5 %

10. АМПЛИТУДОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ НАЗЫВАЮТ

- 1) омическое сопротивление мембраны
- 2) сопротивляемость эритроцитов к механическим воздействиям

- 3) интервал между верхней и нижней границами осмотической резистентности
- 4) интервал около зоны прочности эритроцита

СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ

Задача 1

Что произойдет с эритроцитами, если их поместить в дистиллированную воду? Сколько нужно добавить поваренной соли на 1 литр воды, чтобы полностью предотвратить гемолиз?

Задача 2

Как можно очистить кровь от старых и слабых эритроцитов, используя знания об осмотической резистентности? Предложить набор концентраций растворов для последовательной отмывки эритроцитов.

Задача 3

Определите массу спектрина в одном эритроците.

ЭТАЛОНЫ ОТВЕТОВ К ТЕСТОВЫМ ЗАДАНИЯМ

Тема 1. МЕТОДЫ СТАТИСТИЧЕСКОЙ ОБРАБОТКИ РЕЗУЛЬТАТОВ БИОФИЗИЧЕСКОГО ЭКСПЕРИМЕНТА

- | | |
|--------|---------|
| 1. -2) | 6. -3) |
| 2. -1) | 7. -3) |
| 3. -3) | 8. -3) |
| 4. -1) | 9. -1) |
| 5. -1) | 10. -2) |

Тема 2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ РАЗМЕРОВ БИОМАКРОМОЛЕКУЛ МЕТОДОМ МОНОСЛОЕВ

- | | |
|-----------|-----------------|
| 1. -2) | 6. -1),2),3),4) |
| 2. -3) | 7. -4) |
| 3. -1) | 8. -1),2),5) |
| 4. -2),3) | 9. -1),2),4) |
| 5. -3) | 10. -4) |

Тема 3. ОСМОТИЧЕСКОЕ ДАВЛЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЕЙ

- | | |
|----------------|----------------|
| 1. -1) | 6. -1), 2), 3) |
| 2. -1), 5) | 7. -1) |
| 3. -3) | 8. -3), 4) |
| 4. -1) | 9. -1), 2), 4) |
| 5. -1), 2), 4) | 10. -3) |

Тема 4. ИССЛЕДОВАНИЕ НАБУХАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ТКАНЕЙ ВЕСОВЫМ МЕТОДОМ

- | | |
|----------------|------------|
| 1. -3) | 6. -1), 3) |
| 2. -1) | 7. -2) |
| 3. -3), 4) | 8. -2) |
| 4. -1), 4) | 9. -1) |
| 5. -1), 3), 4) | |

Тема 5. МЕТОД ФОТОЭЛЕКТРОКОЛОРИМЕТРИИ

- | | |
|--------------|--------|
| 1. -2),3) | 6. -2) |
| 2. -1),2),4) | 7. -1) |
| 3. -2) | 8. -2) |
| 4. -2) | |
| 5. -2) | |

Тема 6. СПЕКТРЫ ПОГЛОЩЕНИЯ БЕЛКОВ

- | | |
|------------|------------|
| 1. -4) | 6. -1), 4) |
| 2. -1) | 7. -2) |
| 3. -1), 3) | 8. -1) |
| 4. -3), 4) | |
| 5. -4) | |

Тема 7. ИССЛЕДОВАНИЕ ДИФФУЗИИ ВЕЩЕСТВ ЧЕРЕЗ ПОЛУ-ПРОНИЦАЕМУЮ МЕМБРАНУ

- | | |
|----------------|----------------|
| 1. -1), 2), 4) | 6. -1) |
| 2. -1) | 7. -1), 2), 3) |
| 3. -1), 2), 4) | 8. -3) |
| 4. -3), -4) | 9. -3) |
| 5. -2), -4) | 10. -1) |

Тема 8. ОПРЕДЕЛЕНИЕ РК АМИНОКИСЛОТ

- | | |
|--------------------|------------|
| 1. -1), 2), 3), 4) | 6. -3) |
| 2. -3) | 7. -4) |
| 3. -1), 2) | 8. -2), 3) |
| 4. -1), 2), 3) | 9. -2) |
| 5. -3) | 10. -1) |

Тема 9. ПОТЕНЦИОМЕТРИЧЕСКОЕ ТИТРОВАНИЕ БЕЛКОВ

- | | |
|------------|-------------|
| 1. -2) | 6. -1), 4) |
| 2. -3) | 7. -1) |
| 3. -1) | 8. -1) |
| 4. -1), 4) | 9. -2) |
| 5. -1) | 10. -1), 4) |

Тема 10. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЗАВИСИМОСТИ ПОВЕРХНОСТНОГО НАТЯЖЕНИЯ МОНОСЛОЯ ЛЕГОЧНОГО СУРФАКТАНТА ОТ РАЗМЕРОВ ЕГО ПОВЕРХНОСТИ

- | | |
|----------------|------------|
| 1. -3) | 6. -3) |
| 2. -2) | 7. -4) |
| 3. -1) | 8. -1), 2) |
| 4. -1), 2), 4) | 9. -2), 3) |
| 5. -3) | 10. -4) |

**Тема 11. ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ
ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ**

- | | |
|--------|---------|
| 1. -3) | 6. -3) |
| 2. -1) | 7. -2) |
| 3. -1) | 8. -2) |
| 4. -3) | 9. -1) |
| 5. -1) | 10. -3) |

**Тема 12. ИССЛЕДОВАНИЕ ПОВЕРХНОСТНОГО
НАТЯЖЕНИЯ РАЗЛИЧНЫХ ЖИДКОСТЕЙ МЕТОДОМ
ОТРЫВА КОЛЬЦА**

- | | |
|------------|---------|
| 1. -3), 5) | 6. -1) |
| 2. -3) | 7. -4) |
| 3. -2) | 8. -1) |
| 4. -2) | 9. -4) |
| 5. -2) | 10. -4) |

Тема 13. БУФЕРНАЯ ЕМКОСТЬ КОМПОНЕНТОВ КРОВИ

- | | |
|------------|--------------------|
| 1. -3) | 6. -1) |
| 2. -2), 3) | 7. -4) |
| 3. -3) | 8. -1), 3), 4), 6) |
| 4. -1), 3) | 9. -4) |
| 5. -3) | 10. -1) |

**Тема 14. ИССЛЕДОВАНИЕ ОСМОТИЧЕСКОГО ГЕМОЛИЗА
ЭРИТРОЦИТОВ**

- | | |
|------------|----------------|
| 1. -2) | 6. -1), 3), 5) |
| 2. -1) | 7. -2) |
| 3. -2) | 8. -1) |
| 4. -1) | 9. -3) |
| 5. -2), 5) | 10. -3) |

ЭТАЛОНЫ ОТВЕТОВ К СИТУАЦИОННЫМ ЗАДАЧАМ

Тема 1. МЕТОДЫ СТАТИСТИЧЕСКОЙ ОБРАБОТКИ РЕЗУЛЬТАТОВ БИОФИЗИЧЕСКОГО ЭКСПЕРИМЕНТА

Задача 1

При уровне значимости 0,05 $t_{\text{ф}}=3,01$ больше $t_{\text{кр}}=2,26$ - отличие достоверно; а при уровне значимости 0,01 $t_{\text{ф}}=3,01$ меньше $t_{\text{кр}}=3,25$ – при этом уровне значимости отличия не достоверны.

Задача 2

$5,23 \pm 0,19$ мМоль/л.

Задача 3

$8,35 \pm 0,53$ до введения СО и $5,60 \pm 0,68$ после воздействия. При уровне значимости 0,05 $t_{\text{ф}}=3,19$ больше $t_{\text{кр}}=2,36$ – значит, снижение достоверно.

Тема 2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ РАЗМЕРОВ БИОМАКРОМОЛЕКУЛ МЕТОДОМ МОНОСЛОЕВ

Задача 1

Описанная ситуация связана с тем, что хвосты липидов обладают подвижностью и образуют кинки.

Задача 2

Наименее липидный бислой проницаем для ионов калия и кальция, т. к. они несут заряд, а липидный бислой обладает гидрофобностью.

Задача 3

Увеличение температуры приведет к увеличению проницаемости мембраны.

Тема 3. ОСМОТИЧЕСКОЕ ДАВЛЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЕЙ

Задача 1

Увеличение концентрации глюкозы в крови приведет к росту осмотического давления, вследствие чего клетки крови будут терять воду и сморщиваться.

Задача 2

В гипоосмотической среде эритроциты будут набухать, в гипертонической – сжиматься. Осмотическая резистентность красных клеток крови зависит от упругости мембраны, что во многом связано с белками цитоскелета.

Задача 3

А – гипертонический раствор, В – изотонический раствор, С – гипотонический раствор.
А – 3, В – 1, С – 2.

Тема 4. ИССЛЕДОВАНИЕ НАБУХАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ТКАНЕЙ ВЕСОВЫМ МЕТОДОМ

Задача 1

Скорость набухания можно определить по углу наклона кривой. Наибольшей скоростью набухания обладает полимер с.

Задача 2

Благодаря таким свойствам для направленного транспорта лекарственного вещества в желудок можно использовать гели, содержащие группы слабого основания и поэтому набухающие в кислой среде желудка. Кроме того, такие гели могут служить еще и в качестве защитной оболочки. Они сколлапсированы при нейтральных рН во рту и тем самым предотвращают растворение лекарственного вещества в слюне, избавляя больного от неприятного вкуса горького лекарства. Гели на основе слабой кислоты набухают в щелочной среде (см. рис.), а в желудке при рН 1.4 они сохраняют лекарственное вещество внутри себя. Тем самым препарат не испытывает вредного воздействия столь высокой кислотности, а кроме того, и слизистая желудка не подвергается нежелательному воздействию лекарства. Попадая в кишечник (рН 6,7–7,4), гель набухает и выделяет там вещество.

Тема 5. МЕТОД ФОТОЭЛЕКТРОКОЛОРИМЕТРИИ

Задача 1

Коэффициент пропускания равен 0,83

Задача 2

$n=8$

Задача 3

Концентрация 1 %

Тема 6. СПЕКТРЫ ПОГЛОЩЕНИЯ БЕЛКОВ

Задача 1

Оптическая плотность равна 0,84

Задача 2

Квантовый выход равен 1,45

Задача 3

Интенсивность флуоресценции триптофана уменьшится в 1000 раз.

Тема 7. ИССЛЕДОВАНИЕ ДИФФУЗИИ ВЕЩЕСТВ ЧЕРЕЗ ПОЛУПРОНИЦАЕМУЮ МЕМБРАНУ

Задача 1

Поток формамида через БЛМ равен $0,315 \text{ M cm s}^{-1}$

Задача 2

Коэффициент диффузии равен $3 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$

Задача 3

$D=20$

Тема 8. ОПРЕДЕЛЕНИЕ РК АМИНОКИСЛОТ

Задача 1

С увеличением концентрации пропорционально увеличится и объём титранта, поэтому при увеличении концентрации в 3 раза объём титранта возрастет до 60 мл, при увеличении в 5 раз – до 100 мл.

Задача 2

pK аминокислоты не изменится при изменении ее концентрации в растворе.

Задача 3

Проводить титрование последовательно можно, но в этом случае придется увеличить объем титранта (кислоты) эквивалентно добавленной на первом этапе щелочи.

Тема 9. ПОТЕНЦИОМЕТРИЧЕСКОЕ ТИТРОВАНИЕ БЕЛКОВ

Задача 1

Изменится, так как при нагревании происходит конформационная перестройка трипсина.

Задача 2

Различаются, так как в каждом белке может быть индивидуальное количество основных и кислых аминокислотных остатков.

Задача 3

Можно использовать кривые титрования и показания pK в качестве дифференциального критерия разных белков, так как данные показатели зависят от количества и вида аминокислот, входящий в состав белка.

Тема 10. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЗАВИСИМОСТИ ПОВЕРХНОСТНОГО НАТЯЖЕНИЯ МОНОСЛОЯ ЛЕГОЧНОГО СУРФАКТАНТА ОТ РАЗМЕРОВ ЕГО ПОВЕРХНОСТИ

Задача 1

Разрыв монослоя приведет к повышению поверхностного натяжения. Чтобы скомпенсировать это изменение, необходимо подождать некоторое время для восстановления монослоя сурфактанта.

Задача 2

При отсутствии поверхностно-активного вещества поверхностное давление не будет меняться при изменении размеров поверхности в измерительной ванночке.

Задача 3

При снижении поверхностных свойств индекс стабильности увеличивается, при повышении поверхностно-активных свойств сурфактанта индекс стабильности уменьшается.

Тема 11. ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

Задача 1

Можно по построенному графику зависимости.

Задача 2

В первом измерении к силе поверхностного натяжения желчи добавляется сила поверхностного натяжения жидкости, оставшейся в кончике капилляра.

Задача 3

Причинами отсутствия зависимости могут быть либо низкая концентрация желчи (менее 0,5 %) либо высокая концентрация (более 10 %)

Тема 12. ИССЛЕДОВАНИЕ ПОВЕРХНОСТНОГО НАТЯЖЕНИЯ РАЗЛИЧНЫХ ЖИДКОСТЕЙ МЕТОДОМ ОТРЫВА КОЛЬЦА

Задача 1

Поверхностное натяжение увеличится.

Задача 2

$1,87 \cdot 10^{-3}$ Н/м

Задача 3

0,9

Тема 13. БУФЕРНАЯ ЕМКОСТЬ КОМПОНЕНТОВ КРОВИ

Задача 1

Увеличится

Задача 2

При добавлении кислоты к крови рН будет уменьшаться не так сильно, как при добавлении кислоты к физраствору. Это связано с буферной емкостью крови.

Задача 3

Буферная емкость 1,25 г·экв/л

Тема 14. ИССЛЕДОВАНИЕ ОСМОТИЧЕСКОГО ГЕМОЛИЗА ЭРИТРОЦИТОВ

Задача 1

Произойдет гемолиз. Минимум 8,5 г/л поваренной соли.

Задача 2

Выдерживанием эритроцитов в растворе с пониженной осмолярностью. Сначала выдержать в растворе с концентрацией поваренной соли 0,48 %, затем отмыть в 0,85 % растворе.

Задача 3

Масса спектрина = $1,2 \cdot 10^{-12} \cdot 0,5 \cdot 0,76 = 4,56 \cdot 10^{-13}$ г.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

Основная

1. Антонов, В. Ф. Физика и биофизика [Текст]: курс лекций для студентов медицинских вузов : учебное пособие для студентов медицинских вузов / В. Ф. Антонов, А. В. Коржуев. – 3-е изд., перераб. и доп. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2006. – 240 с.
2. Лекции по биофизике [Текст]: учебное пособие для студентов, обучающихся по специальностям 04.08.00–Медицинская биохимия, 04.09.00–Медицинская биофизика, 04.10.00–Медицинская кибернетика / М. Б. Баскаков [и др.]; Сибирский медицинский университет (Томск). – Томск : Сибирский государственный медицинский университет, 2009. – 200 с.

Дополнительная

1. Методы эмиссионного спектрального анализа в биофизике [Текст] : учебное пособие для студентов, обучающихся по специальностям 060121 (040800) – Медицинская биохимия, 060113 (040900) – Медицинская биофизика, 060114 (041000) – Медицинская кибернетика / М. Б. Баскаков [и др.]; Сибирский медицинский университет (Томск). – Томск : б. и., 2006. – 82 с.

Учебное издание

**РУКОВОДСТВО
К ПРАКТИЧЕСКИМ ЗАНЯТИЯМ
ПО ОБЩЕЙ И МЕДИЦИНСКОЙ БИОФИЗИКЕ**

под редакцией проф. М. Б. Баскакова

Учебное пособие в двух частях
Часть 1

Редактор Харитоновна Е.М.
Технический редактор, оригинал-макет Забоенкова И.Г.
Корректор Зеленская И.А.
Дизайн обложки Смаглий Л.В.
Редакционно-издательский отдел СибГМУ
634050, г. Томск, пр. Ленина, 107
тел. 8(382-2) 51-41-53
факс. 8(382-2) 51-53-15
E-mail: bulletin@bulletin.tomsk.ru

Подписано в печать 28.01.2013 г.
Формат 60x84 $\frac{1}{16}$. Бумага офсетная.
Печать ризограф. Гарнитура «Times». Печ. лист. 7,8
Тираж 100 экз. Заказ № 17

Отпечатано в лаборатории оперативной полиграфии СибГМУ
634050, Томск, ул. Московский тракт, 2