

Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского
Биологический факультет

МАЛЫЙ ПРАКТИКУМ ПО БИОФИЗИКЕ

Издание седьмое

**44.03.01 – ПЕДАГОГИЧЕСКОЕ ОБРАЗОВАНИЕ
ПРОФИЛЬ «БИОЛОГИЯ»**

САРАТОВ 2022

УДК 577.3(076.5)
ББК 28.071 Я 73
М54

Составители:

М.В. Каневский, И.К. Миронова

Малый практикум по биофизике: Учебно-методическое пособие 7-е изд. / Сост.: М.В. Каневский, И.К. Миронова – Саратов: Изд-во Саратов. ун-та, 2022. – 55 с.: ил.

ISBN 5-292-02946-7

В пособии описываются биофизические и физико-химические методы исследования биологических объектов и модельных систем. Практические задания сопровождаются освещением теоретических вопросов, раскрывающих основы каждого метода и особенности их использования в биологических исследованиях.

Для студентов биологического факультета, обучающихся по направлению 44.03.01 – Педагогическое образование профиль «Биология».

Рекомендуют к печати:

Кафедра биохимии и биофизики Саратовского государственного университета
Научно-методическая комиссия биологического факультета Саратовского государственного университета

Печатается по решению ученого совета биологического факультета
Саратовского государственного университета

УДК 577.3(076.5)
ББК 28.071 Я 73

ISBN 5-292-02946-7

© М.В. Каневский, И.К. Миронова
составление, 2022

РАБОТА 1. МЕТОДЫ РЕГИСТРАЦИИ РАДИОАКТИВНЫХ ИЗЛУЧЕНИЙ

Радиоактивные излучения могут быть обнаружены и измерены по тем физическим процессам, которые происходят при взаимодействии излучений с веществом. Наиболее распространенным методом регистрации излучений является ионизационный метод, основанный на измерении непосредственно ионизационного эффекта, вызываемого излучением при прохождении через вещество.

Помимо ионизационного используют фоторадиографический, люминесцентный, химический и другие методы измерений, которые основаны на вторичных эффектах, происходящих в результате ионизации.

Камера Вильсона позволяет наблюдать следы отдельных заряженных частиц. Они становятся видны благодаря тому, что на ионах, образованных частицами в камере, пересыщенные пары конденсируются в виде мельчайших капелек. По плотности следа можно судить о плотности ионизации, а, следовательно, и о природе ионизирующей частицы. В камере, помещенной в магнитное поле, по следу частицы можно определить ее заряд, массу и энергию.

Авторадиографический или фоторадиографический метод основан на том, что на фотографическую пленку или пластинку действуют ионизирующие излучения, в результате ионизации в фотоэмульсии происходят фотохимические процессы, вследствие которых после проявления вдоль следов α - и β - частиц выделяются зерна серебра. По числу следов в фотоэмульсии можно судить об интенсивности потока излучений, а по длине следа определяют энергию частиц. Доза γ -излучения измеряется по суммарному почернению фотопластинки.

Метод счета сцинтилляций основан на том, что некоторые вещества, например сернистый цинк, антрацен, светятся (люминесцируют) под влиянием излучения. Слабые световые вспышки, усиленные фотоумножителем, могут быть затем зарегистрированы измерительным прибором. Прибор, состоящий из люминесцентного кристалла и фотоумножителя, называется люминесцентным, или сцинтилляционным счетчиком.

Калориметрический метод основан на измерении энергии излучений и активности препаратов по тому тепловому эффекту, который получается при поглощении излучения веществом. Для этой цели используются специальные калориметры, внутрь которых помещается радиоактивное вещество; излучение этого вещества полностью поглощается стенками калориметра.

Химический метод. Под воздействием излучения химические вещества изменяют свои свойства: изменяется цвет растворов, выделяются газы из соедине-

ний, происходит осаждение коллоидов и т. п. Степень этих изменений зависит от дозы излучения. Химические методы дозиметрии являются малочувствительными и используются в основном для измерения больших доз излучения.

Радиометрический, или ионизированный метод является самым точным и наиболее широко применяемым методом регистрации излучений. Он основан на определении ионизационного тока, возникающего под влиянием радиоактивных излучений в ионизационной камере.

Существуют разнообразные типы ионизационных камер, но принцип устройства у всех один. Любая ионизационная камера представляет собой воздушный или газовый конденсатор. Ток, возникающий от ионизации газа радиоактивной частицей будет зависеть от величин приложенного на пластины конденсатора напряжения.

Рассмотрим вольт-амперную характеристику ионизационной камеры (рисунок 1.1):

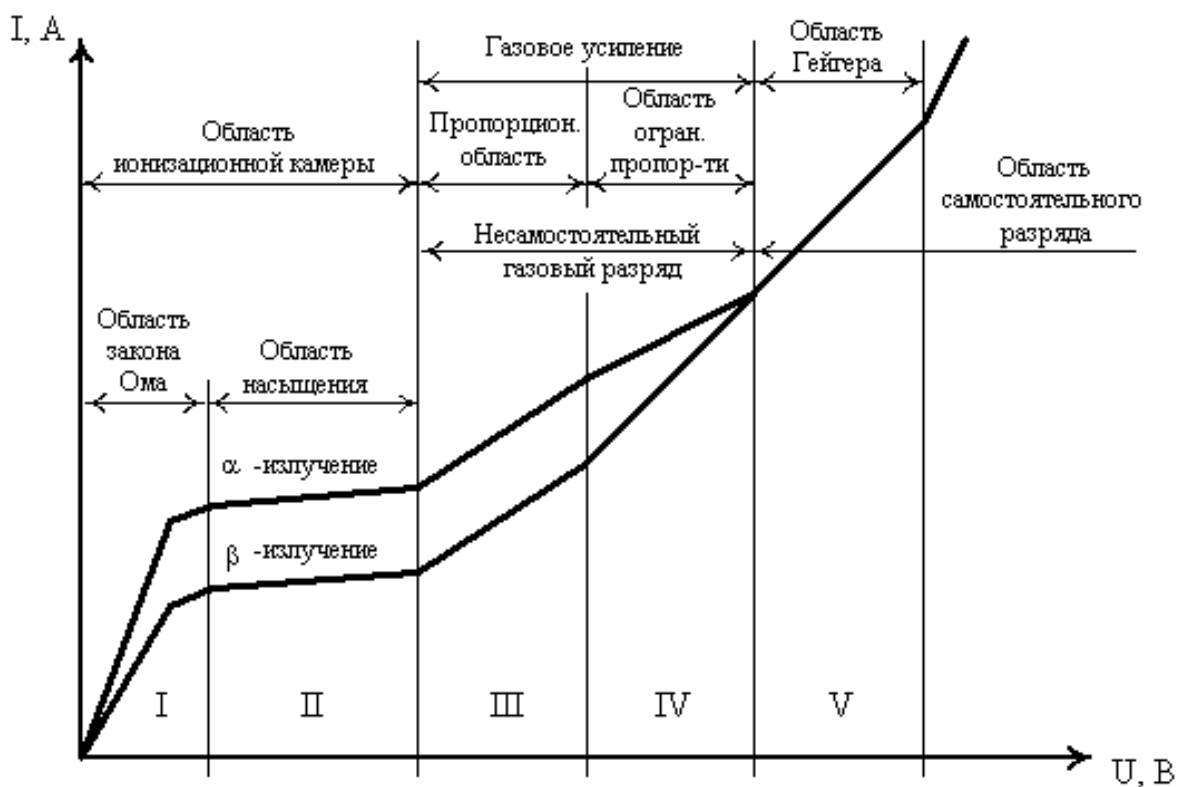


Рисунок 1.1 – Вольт-амперная характеристика ионизационной камеры

I – область первичной ионизации, где идет увеличение силы ионизационного тока i прямолинейно, $i = n \times e$, (где n – число пар ионов; e – заряд одного иона);

II – область тока насыщения;

III – область пропорциональности, где имеется строгая пропорциональность между числом ионов, образованных в области первичной ионизации n , и числом ионов, образованных при вторичной ионизации n_0 , соответственно сила ионизационного тока в этой области увеличивается пропорционально энергии радиоактивных излучений;

IV – область ограниченной пропорциональности, где нарушается пропорциональность между n_0 и n .

V – область Гейгера. В области Гейгера сила тока уже совершенно не зависит от первичной ионизации, а определяется только напряжением V .

Область пропорциональности используется в пропорциональных счетчиках. Эти счетчики применяются для измерения энергии частиц или для регистрации в смешанном потоке сильно ионизирующих частиц. Например, если в пропорциональный счетчик попадают α - и β -частицы, то вследствие того, что α -частицы создают на одинаковом пути в счетчике в несколько сот раз большее число пар ионов, чем β -частицы, импульс в счетчике α -частиц также будет в несколько сот раз больше. Регистрируя только большие импульсы и не регистрируя малые, можно производить счет α -частиц на фоне β -частиц.

Область Гейгера применяется в счетчиках Гейгера-Мюллера, отчего она и получила свое название.

1.1. СЧЕТЧИКИ ГЕЙГЕРА-МЮЛЛЕРА

Счетчики Гейгера представляют собой цилиндрические конденсаторы с неравными по площади электродами. Анод изготавливается из тонкой металлической, обычно вольфрамовой или молибденовой, проволоки толщиной 0,1 – 0,2 мм. У катода наружный цилиндр либо металлический, либо стеклянный с нанесенным изнутри металлическим слоем.

Диаметр цилиндра 1-3 см. Счетчики наполняются газом при пониженном давлении (50-60 мм рт.ст). Заполняется счетчик обычно аргоном в смеси с другими газами.

Счетчики Гейгера делятся на два типа: несамогасящиеся и самогасящиеся. Для гашения разряда в первых счетчиках требуются специальные устройства. Во вторых счетчиках разряд гасится с помощью молекул этилового спирта, примесь которого имеется в счетчике.

Механизм разряда в счетчике Гейгера. Когда во внутренний объем счетной трубки попадает ядерная частица, она производит первичную ионизацию. Образовавшиеся при этом положительные ионы аргона движутся к катоду, к

стенке трубки, а электроны – к аноду, к нити. В области нити густота силовых линий очень велика, так как поверхность нити много меньше поверхности стенки трубки, и именно здесь напряженность электрического поля достигает величины области Гейгера. Под влиянием высокого напряжения движущиеся к нити (аноду) электроны приобретают большие ускорения и производят ударную вторичную ионизацию.

Положительные ионы аргона движутся к катоду. На пути они приобретают довольно большую скорость и, ударяясь о металлический катод, выбивают из него большее число электронов, чем необходимо для нейтрализации положительных ионов. Оказавшиеся свободными электроны направляются к аноду – нити и, попадая в область высоких напряжений, в свою очередь производят ударную ионизацию и т.д.

Таким образом, ионизация, раз начавшаяся из-за попадания в счетчик одной ядерной частицы, продолжается со всё большей интенсивностью. Число вторичных ионов лавинообразно нарастает. Счетная установка, в которую включена счетная трубка, отмечает появление ионизационного тока – регистрирует импульс.

Если в это время в счетчик проникает вторая ядерная частица, то произведенная ею ионизация не изменит по существу имевшуюся картину. Для того чтобы можно было зарегистрировать появление в счетчике второй ядерной частицы, ионизацию, возникшую по поводу первой ядерной частицы, надо остановить.

В несамогасящихся счетчиках, чтобы остановить нарастающую вторичную ионизацию, снижается на аноде напряжение. Электроны, не получая больших ускорений, теряют способность производить ударную ионизацию, и новообразование прекращается. Затем подаваемое на нить напряжение вновь повышается, и счетная трубка снова готова к работе. Такой способ гашения разряда требует сравнительно большого времени и сложной электронной аппаратуры. Несамогасящиеся счетчики могут отдельно регистрировать не более 100 – 1000 имп./сек.

В самогасящихся счетчиках, кроме газа аргона, находятся еще пары многоатомных спиртов или других органических соединений, (смесь состоит обычно из 90% аргона и 10% паров спирта). Они имеют слабосвязанный электрон, который может легко отходить от молекулы спирта и присоединяться к положительному иону аргона. Таким образом, ионы аргона превращаются в электрически нейтральные атомы, еще не успев достигнуть катода. К катоду вместо легких ионов движутся тогда тяжелые ионы спирта, они не приобретают больших ускорений и, дойдя до катода, нейтрализуются на нем, не выбивая при этом лишних электронов. Таким образом, высвобождение электронов прекращается, а вместе с тем прекращается и вторичная ионизация. Счетчик снова готов к реги-

страции ядерной частицы. Самогасящиеся счетчики могут регистрировать до 10.000 имп./сек.

Рабочее напряжение счетчика – напряжение, при котором счетчик работает с максимальной эффективностью. Оно определяется экспериментально. Для этого снимают кривую зависимости скорости счета от напряжения на счетчике при одинаковом числе ежесекундно попадающих в счетчик частиц. Такая кривая называется счетной характеристикой.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА

Упражнение 1. Знакомство с устройством счетных установок типа Б.

Знакомство с устройством счетных установок типа Б необходимо начать с изучения блок-схемы и каждого узла установки. Высоковольтный выпрямитель ВСЭ-2500 питается от сети переменного тока. От него напряжение передается через блок газового счетчика БГС к счетной трубке. Возникающий в счетной трубке импульс усиливается в БГС и передается на пересчетную схему ПС-64, где этот импульс дополнительно усиливается и формируется. От пересчетной схемы импульс передается на электромеханический счетчик и там регистрируется.

Нужное напряжение на выходе прибора устанавливают, поворачивая вправо рукоятку “регулятор напряжения” и наблюдая при этом за показаниями киловольтметра. В схеме ВСЭ-2500 имеется довольно большая емкость, поэтому напряжение устанавливается медленно, осторожным поворотом “регулятора напряжения”.

Импульсы, возникающие в счетной трубке при попадании в нее ядерных частиц или γ -квантов, усиливаются БГС и передаются на пересчетную схему ПС-64. Пересчетная схема ПС-64 - наиболее сложное звено установки Б. Ее назначение состоит не только в том, чтобы усиливать и формировать поступающие от счетной трубки импульсы, но и в том, чтобы в случае необходимости передавать на механический счетчик не все возникающие в счетной трубке импульсы, а некоторое кратное число от них. Это важно потому, что электромеханический счетчик обладает большей инерцией и может регистрировать в 1 с не более 100 импульсов – в 100 раз меньше, чем счетная трубка. Для того чтобы более полно использовать возможности счетной трубки, между ней и электромеханическим счетчиком помещают ПС-64.

ПС-64 имеет шесть пересчетных каскадов. Они устроены так, что каждый пересчетный каскад задерживает первый из двух поступивших на него импульсов и передает на следующий каскад только каждый второй импульс. Устройство ПС-64 позволяет регистрировать импульсы без пересчета, используя лишь

усилитель, и работать с двумя, четырьмя или всеми шестью каскадами. Очевидно, при работе с двумя каскадами на электромеханический счетчик будет передаваться каждый четвертый из возникающих в счетной трубке импульсов; при работе с четырьмя каскадами - каждый шестнадцатый; при работе с шестью каскадами - каждый шестьдесят четвертый. Включение в работу необходимого числа пересчетных каскадов достигается установкой в рабочее положение соответствующего переключателя в положение “х4”, “х16”, “х64”. Если же он включается в положение “х1”, то на электромеханический счетчик передаются все возникающие в счетной трубке импульсы, минуя пересчетные каскады.

На передней панели кроме тумблеров пересчетных каскадов, сетевого тумблера, тумблера включения счета (“Пуск”), расположены шесть индикаторных неоновых лампочек на каждый пересчетный каскад. Зажигание лампочки показывает, что на каскаде задержался импульс. Цифры, расположенные около индикаторных лампочек, показывают, какому числу, поступивших на вход ПС-64 импульсов соответствует присутствие одного импульса на данном каскаде. Перед началом работы “сбрасывают” все присутствующие на пересчетных каскадах импульсы, достигая этого нажатием кнопки “Сброс”.

Включение в положение “Проверка” дает возможность переключать ПС-64 на прием импульсов от сети переменного тока. Это важно потому, что сложная схема нуждается время от времени в проверке. Для этого надо подавать для пересчета строго определенное число импульсов в единицу времени. Для этой цели более всего подходит подача импульсов от сети переменного тока – 50 импульсов в 1с или 3000 импульсов в минуту.

Электромеханический счетчик предназначен для регистрации импульсов, поступающих на него с пересчетной схемы. На передней панели счетчика имеются два диска циферблата. За время, когда стрелка на первом циферблате проходит полный круг (100 делений), стрелка на втором циферблате проходит (постепенно) одно деление. Поэтому на установку нуля в начале работы надо обратить серьезное внимание: неточная установка может дать при снятии показаний ошибку на 100 отсчетов. Запись результатов отсчетов ведут следующим образом: показания ЭМС умножают на коэффициент пересчета и прибавляют к произведению сумму, показанную цифрами у индикаторных неоновых лампочек. Рассчитать число импульсов в минуту можно по следующей формуле:

$$N = \frac{a \times b + c}{t} \quad (1.1),$$

где a – показания ЭМС;

b – коэффициент пересчета;
 c – показания неоновых лампочек;
 t – время счета импульсов.

Стрелки-указатели передвигаются только при поступлении импульсов. Для того чтобы установить нуль перед началом отсчета, передвигают циферблаты.

Упражнение 2. Проверка пересчетной схемы ПС-64. Незначительная неточность в работе пересчетных каскадов может привести к большим ошибкам в конечном результате счета. Поэтому конструкцией ПС-64 предусмотрена возможность проверки ее работы. Для проверки на ПС-64 подают для счета строго постоянное число импульсов в единицу времени. Для этой цели служат импульсы от сети переменного тока. Для проверки ПС-64 включают в сеть переменного тока, предварительно установив, соответствует ли включение трансформатора схемы напряжению питающей сети. Во время проверки ПС-64 выпрямитель ВСЭ-2500 в сеть не включают, звенья установки Б-2 между собой могут быть не соединены. Включают тумблер “Сеть” и несколько минут ждут, пока прогреется пересчетная схема. О достаточном прогреве свидетельствуют загоревшиеся индикаторные лампочки. Нажимая кнопку “Сброс”, освобождают все пересчетные каскады от находившихся на них импульсов. Переключатель ставят в положение “Проверка”. При работе с установкой Б-2 проверку делают только для коэффициента пересчета “х64”, как это и предусмотрено схемой установки.

В последнюю очередь устанавливают на нуль циферблаты электромеханического счетчика. Делать это раньше не следует, так как при сбросе стрелка-указатель может переместиться. Включают одновременно секундомер и тумблер “Пуск” и считают число колебаний в сети переменного тока в течение трех минут.

По истечении этого времени выключают тумблер “Пуск” и секундомер.

Как известно, частота колебаний в сети переменного тока равна 3000 колебаниям в минуту. Если полученный при отсчете результат отклоняется от 3000 не более чем на 2%, можно считать, что ПС-64 работает исправно.

Обычно отклонения бывают значительно меньше двух процентов - порядка десятых и даже сотых долей процента. Большие ошибки получаются, как правило, при неодновременном включении или выключении тумблера “Пуск” и секундомера, т.е. тогда, когда время проведения отсчета отличалось от заданного.

Результат заносят в табл. 1.1:

Таблица 1.1

Число отсчетов			Ошибка, %
За 3 минуты	За 1 минуту	В среднем за 1 минуту	

Упражнение 3. Снятие рабочей характеристики счетной трубки. При работе со счетной трубкой надо выяснить, какие напряжения для данной трубки соответствуют области Гейгера. Опытным путем - снятием рабочей характеристики точно устанавливается рабочее напряжение для каждого экземпляра. Для снятия рабочей характеристики счетную трубку присоединяют к блоку газового счетчика. При этом контакт нити присоединяют к контакту БГС, а корпус трубки – к движку ползьев БГС. Включают определенный коэффициент пересчета. Рабочую характеристику можно снимать, поместив под трубку радиоактивный препарат (с нагрузкой), и без радиоактивного препарата (без нагрузки). Включают сетевые тумблеры на передних панелях ВСЭ-2500 и ПС-64 и прогревают установку в течение нескольких минут.

Устанавливают напряжение 200 – 300 В. Включают одновременно секундомер и тумблер “Пуск” и ведут счет в течение одной минуты. Затем выключают секундомер и тумблер “Пуск” и смотрят, не загорелись ли лампочки, что будет свидетельствовать о попадании в пересчетную систему первых импульсов. Затем повышают напряжение на выходе ВСЭ-2500 на 100 В и снова ведут счет в течение одной минуты и так до тех пор, пока установкой не будут зарегистрированы первые отсчеты. После регистрации первых отсчетов надо увеличивать напряжение после каждого измерения не на 100, а на 50 В и считать в течение 1 минуты. Начало работы счетной трубки соответствует области пропорциональности; при этих напряжениях не всякая частица вызывает образование лавины ионов, необходимой для возникновения импульса. При дальнейшем повышении напряжения число зарегистрированных в минуту импульсов будет расти.

Затем наступит момент, когда увеличение напряжения не будет приводить к увеличению скорости счета или это увеличение будет незначительным. Область напряжений, в которой значительные изменения напряжения не сказываются на числе зарегистрированных в единицу времени импульсов, соответствует напряжению области Гейгера. В рабочей характеристике счетной трубки эту область называют областью плато. При этих напряжениях попадание в объем счетной трубки каждой ядерной частицы ведет к образованию лавины ионов и возникновению большого ионизационного тока, который и отмечается счетной установкой. У разных экземпляров счетных трубок одного и того же типа плато может иметь большую или меньшую протяженность, быть практически горизонталь-

ным или слегка наклонным. По мере работы трубки и расходования молекул спирта плато уменьшается по протяженности и перемещается в область высоких напряжений. Это связано с тем, что давление во внутреннем объеме счетной трубки повышается, так как число молекул увеличивается за счет того, что место одной большой молекулы спирта замещается обломками. При повышении давления требуются большие напряжения для того, чтобы электроны и ионы приобретали необходимые ускорения.

При снятии показаний со счетной установки надо обращать внимание на индикаторные лампочки. Это особенно важно в тех случаях, когда работа ведется при большом коэффициенте пересчета — “х16” или “х64”, а число отсчетов в единицу времени невелико (например, при отсчете импульсов естественного фона или при относительно малых напряжениях, когда счетная установка регистрирует не все попадающие во внутренний объем трубки ядерные частицы). При этом часто бывает так, что число зарегистрированных за единицу времени импульсов меньше, чем коэффициент пересчета. Тогда стрелка механического счетчика остается на нуле, а о числе импульсов можно судить только по показаниям индикаторных лампочек. Результаты отсчетов заносят в протокол в виде табл. 1.2:

Таблица 1.2

Напряжение, В	Число отсчетов за 1 минуту
300	—
400	—
500	$0 \times 64 + 5 = 5$
600	$0 \times 64 + 27 = 27$
700	$14 \times 64 + 18 = 914$
800 и т.д.	$15 \times 64 + 40 = 1000$

Очевидно, что число импульсов, зарегистрированных счетной установкой от данного препарата, может значительно колебаться даже при работе в области плато, где напряжение не влияет заметным образом на скорость счёта. В ряде случаев при больших напряжениях скорость счета может даже оказаться несколько ниже, чем при меньших напряжениях. Квадратичная ошибка (корень квадратный из числа отсчетов в единицу времени) показывает, в каких пределах может колебаться данная величина, найденная при измерении в пределах плато.

На основании полученных в работе данных строят график. Для того чтобы характеристическая кривая была максимально правильной, на графике следует откладывать и квадратичную ошибку и учитывать эту ошибку при окончательном проведении результирующей линии. При построении графика по оси ординат откладывают скорость счета, но, кроме того, около каждой точки надо от-

кладывать вверх и вниз значение квадратичной ошибки для данной величины. Если соединить между собой все точки, показывающие величины квадратичных ошибок, получается “полоса”, в пределах которой можно строить характеристическую кривую счетной трубки.

Упражнение 4. Выбор рабочей точки и определение уровня фона. После снятия рабочей характеристики счетной трубки выбирают напряжение, при котором будет вестись дальнейшая работа на этой счетной трубке. Такое напряжение называют рабочей точкой трубки.

Находить рабочую точку удобнее всего на графике; выбирать ее рекомендуется в первой половине плато. Для проверки правильности выбора устанавливают рабочее напряжение и определяют уровень естественного радиоактивного фона. Импульсы естественного радиоактивного фона считают 5 – 10 раз.

Продолжительность каждого отсчета три минуты. Определяют среднее арифметическое для полученных отсчетов и находят квадратическую ошибку. Если полученные в работе данные отличаются от среднего арифметического не больше чем на \pm квадратическую ошибку, можно считать, что определение уровня естественного радиоактивного фона сделано правильно.

Поскольку для каждого типа счетных трубок характерен определенный уровень фона, то в случае, если рабочее напряжение для счетной трубки выбрано правильно и работа ведется в незагрязненном помещении, число импульсов фона, отсчитываемых за одну минуту, должно приблизительно соответствовать величинам, приведенным в табл. 1.2.

По результатам работы сделать выводы:

О работоспособности прибора.

О том, в каких диапазонах находится рабочая область у прибора.

Контрольные вопросы

1. Устройство радиометрической установки типа Б.
2. Качественные и количественные методы регистрации ионизирующего излучения.
3. Основные различия в устройстве ионизационной камеры и счетчика Гейгера.
4. Принцип работы счетчика Гейгера.
5. В чем отличия альфа и бета частиц.
6. Три эффекта взаимодействия гамма излучения с веществом.

РАБОТА 2. ПОВЕРХНОСТНОЕ НАТЯЖЕНИЕ

На поверхности раздела двух фаз всегда возникает силовое поле. Причиной его возникновения служит нескомпенсированность молекулярных сил в поверхностном слое. Напряженность такого силового поля можно выразить через поверхностное натяжение. Последнее представляет собой избыток свободной энергии, приходящийся на соответствующий 1 см^2 поверхности раздела фаз.

Наличие поверхностного натяжения становится ясным из сопоставления поведения молекул, расположенных на поверхности раздела, и молекул, находящихся в толще жидкой фазы. Молекулы, находящиеся в толще жидкости, испытывают действие сил взаимного притяжения со стороны соседних молекул. Силы взаимного притяжения, действующие между молекулами, таким образом, уравниваются друг друга. Иначе говоря, равнодействующая этих сил равна нулю.

Совершенно по-другому ведут себя молекулы, находящиеся на поверхности раздела между жидкостью и находящимся с ней в равновесии газом или паром. В этом случае молекулы жидкости испытывают притяжение только со стороны молекул, находящихся под поверхностью раздела. Действием же молекул газообразной фазы ввиду их крайне низкой концентрации можно пренебречь. В итоге равнодействующая межмолекулярных сил на поверхности раздела не равна нулю и оказывается направленной внутрь жидкой фазы. Вот почему для перехода молекул из внутренних слоев жидкости на ее поверхность (т.е. для увеличения поверхности) они должны преодолеть силы взаимного притяжения, действующие и между молекулами поверхностного слоя.

Работа, затрачиваемая на увеличение площади поверхности жидкости, носит название поверхностного натяжения и определяется по формуле

$$A = S \times \sigma, \quad (2.1)$$

где S – площадь поверхности, см^2 ;

σ – коэффициент поверхностного натяжения.

Коэффициентом поверхностного натяжения называется работа, которую нужно произвести, чтобы увеличить площадь поверхности раздела на единицу площади поверхности. Соответственно коэффициент поверхностного натяжения выражают в $\text{эрг} \times \text{см}^2$.

Так как эрг – это дина × см, то $\text{эрг} \times \text{см}^{-2} = \text{дина} \times \text{см}^{-1}$, т.е. коэффициент поверхностного натяжения можно так же выразить, как силу, которую нужно приложить к периметру поверхности раздела для увеличения длины периметра на единицу длины.

Принято различать статическое и динамическое поверхностные натяжения.

Динамическое поверхностное натяжение ($\sigma_{\text{дин}}$) характеризует только что образованную поверхность раздела, состав которой тождествен всей толще раствора.

Статическое поверхностное натяжение характеризует поверхность раздела при наступившем адсорбционном равновесии.

У абсолютно чистых жидкостей (воды, бензола, абсолютного спирта и т.д.) поверхностный слой и вся толща жидкой фазы вполне равноценны по своему составу. Поверхностное натяжение подобного рода жидкостей с течением времени соответственно не изменяется. Иначе говоря, у таких жидкостей значение $\sigma_{\text{стат}}$ и $\sigma_{\text{дин}}$ совпадает. Поверхностно-активным веществом (ПАВ) называют химическое соединение, которое адсорбируется на поверхности раздела фаз, и способно образовывать на данной границе слой повышенной концентрации. У растворов поверхностно активных веществ поверхностный слой имеет свойства, близкие к свойствам всей толщ жидкой фазы только в момент формирования поверхности раздела. Тотчас же после образования поверхности начинается адсорбция поверхностно-активных веществ, заканчивающаяся спустя известный промежуток времени адсорбционным равновесием.

Поскольку поверхностно-активные вещества понижают поверхностное натяжение, постольку в растворах таких веществ $\sigma_{\text{стат}}$ всегда ниже, чем $\sigma_{\text{дин}}$. В некоторых биологических жидкостях существуют особые взаимоотношения между динамическим и статическим поверхностным натяжением. Например, плазма и сыворотка крови обладают свойством восстанавливать исходную величину поверхностного натяжения, уменьшившуюся в результате добавления поверхностно-активных веществ. Такая способность растворов восстанавливать исходную величину поверхностного натяжения называется поверхностной буферностью. Как было показано в экспериментах, поверхностная буферность сыворотки объясняется наличием в ней ионов кальция. Последние, реагируя с поверхностно-активными жирными кислотами, образуют с ними нерастворимые соли, не способные уже изменять величину поверхностного натяжения. Немалую роль в поддержании постоянства поверхностного натяжения плазмы и сыворотки играют содержащиеся в них белки, которые адсорбируют поверхностно активные вещества.

Таким образом, благодаря наличию белков и ионов кальция плазма и сыворотка крови сохраняют относительное постоянство величины поверхностного

натяжения, резко изменяющейся только в случаях тяжелых заболеваний (например, при желтухе вследствие попадания большого количества желчных кислот в кровяное русло).

При изучении поверхностной буферности системы необходимо проследить кинетику перехода динамического поверхностного натяжения в статическое после добавления к раствору поверхностно-активного вещества. Любой раствор, обладающий поверхностной буферностью, должен постепенно восстанавливать исходную величину поверхностного натяжения, понизившегося под влиянием поверхностно-активного вещества. Следовательно, для построения кривой, характеризующей поверхностную буферность раствора, необходимо измерить его поверхностное натяжение до прибавления поверхностно-активного вещества, немедленно после прибавления и через некоторые промежутки времени, вплоть до установления равновесия, т.е. до тех пор, пока значение поверхностного натяжения не перестанет изменяться.

Методы измерения. Измерение поверхностного натяжения плазмы, сыворотки, мочи и спинномозговой жидкости имеет существенное значение для диагностики ряда заболеваний. Существует ряд методов определения поверхностного натяжения жидкостей: сталагмометрический метод (метод подсчёта капель), метод капиллярного поднятия жидкостей, метод пульсирующих струй, метод наибольшего давления пузырька (капли), метод отрыва твердого контура и т.д.

В биологии часто применяют метод дю Нуи, основанный на измерении силы, необходимой для отрыва твердого контура (кольца) от поверхностного слоя жидкости. Он отличается простотой и быстротой проведения измерений, не требует больших количеств жидкости и особенно удобен при изучении динамики поверхностного натяжения в растворах, содержащих поверхностно-активные вещества.

Однако метод определения поверхностного натяжения по отрыву кольца обладает известными недостатками. Так, пользуясь этим методом, невозможно учесть влияние смачивания кольца при соприкосновении последнего с растворами белковых и других высокомолекулярных веществ, что влечет за собой появление ошибок.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА

Упражнение 1. Определение коэффициента поверхностного натяжения воды. При определении поверхностного натяжения воды платиновое кольцо, предварительно очищенное прокаливанием в пламени спиртовки, берут за дужку анатомическим пинцетом и подвешивают на крючок торсионных весов.

Кольцо тщательно взвешивают, после чего весы переводят в положение «закрыто» – арретируют – без возвращения указателя к нулю. Воду в количестве 0,5 – 1 мл наливают на тщательно вымытое и сухое часовое стекло, которое помещают на подъемный столик.

С помощью кремальеры подъемного столика часовое стекло поднимают до тех пор, пока поверхность жидкости не соприкоснется с кольцом (“топить” кольцо в жидкости не следует). После этого освобождают коромысло весов и медленно поворачивают рычаг натяжения, пока кольцо не оторвется от жидкости. Во время этой манипуляции надо все время следить за кольцом и прекратить движение рычага натяжения точно в момент отрыва кольца.

Записав полученные данные, быстро опускают подъемный столик и взвешивают кольцо с прилипшей к нему жидкостью. Истинную силу отрыва кольца определяют по формуле:

$$P = P_1 - p \quad (2.2)$$

где P_1 – сила отрыва, определенная в опыте, мг;

p – вес кольца с прилипшей к нему жидкостью, мг.

Поверхностное натяжение воды определяется по формуле:

$$\sigma = \frac{P}{2\pi r} \quad (2.3)$$

где P – истинная сила отрыва, дин ;

r – наружный радиус платинового кольца, см.

Для того чтобы выразить P в динах, следует данные, полученные в опыте и рассчитанные по формуле (4.2), разделить на 1000 для перевода миллиграммов в граммы и умножить на 981 ($1\text{г} = 981$ дин). Поэтому в работе удобно пользоваться формулой (2.3) в несколько измененном виде:

$$\sigma = \frac{P \times 981}{\pi \times D \times 1000} = \frac{P \times 0,981}{\pi \times D} \quad (2.3a)$$

Радиус платинового кольца заменяют его диаметром во избежание лишних арифметических операций, так как непосредственно в опыте приходится измерять именно диаметр кольца. Ввиду того, что маленькие платиновые кольца не

всегда имеют идеальную правильную форму, следует измерять диаметр 3-4 раза в разных направлениях и брать для расчета среднюю величину.

Упражнение 2. Определение константы платинового кольца. Определение поверхностного натяжения различных жидкостей. Для определения поверхностного натяжения различных жидкостей опыт проводят тем же порядком, что и при определении поверхностного натяжения воды, однако расчеты при этом имеют значительные отличия.

Уравнения (2.3 и 2.3а) справедливы только для воды. Зависимость между силой отрыва и величиной поверхностного натяжения для других жидкостей, в особенности для плохо смачивающих кольцо, оказывается более сложной.

Для того чтобы определить поверхностное натяжение исследуемой жидкости, прежде всего вычисляют отношение силы отрыва кольца от данной жидкости к силе отрыва кольца от воды при данной температуре:

$$Q_{\text{найден}} = \frac{P_x}{P_{H_2O}} \quad (2.4)$$

где P_x – сила отрыва от данной жидкости, мг;
 P_{H_2O} – сила отрыва от воды, мг.

$Q_{\text{истин}}$ равно отношению абсолютного поверхностного натяжения данной жидкости к абсолютному поверхностному натяжению воды, т. е.

$$Q_{\text{истин}} = \frac{\sigma_x}{\sigma_{H_2O}} \quad (2.5)$$

где σ_{H_2O} – коэффициент поверхностного натяжения воды, дин/см;
 σ_x – коэффициент поверхностного натяжения исследуемой жидкости.

$Q_{\text{найден}}$ связано с $Q_{\text{истин}}$ данной жидкости зависимостью, которая выражается уравнением:

$$Q_{\text{истин}} = Q_{\text{найден}} \times K - K + 1 \quad (2.6)$$

где K – эмпирическая константа, экспериментально определяемая для каждого кольца.

Вынося K за скобки, получаем:

$$Q_{истин} = K(Q_{найден} - 1) + 1, \quad (2.7)$$

откуда

$$Q_{истин} - 1 = K(Q_{найден} - 1) \quad (2.8)$$

или

$$K = \frac{Q_{истин} - 1}{Q_{найден} - 1} \quad (2.9)$$

Подставляя в уравнение (4.9) значения $Q_{истин}$ и $Q_{найден}$ из (2.5) и (2.6), получим:

$$K = \frac{\frac{\sigma_x - 1}{\sigma_{H_2O}}}{\frac{P_x - 1}{P_{H_2O}}} \quad (2.10)$$

Для определения константы платинового кольца экспериментальным методом применяют дистиллированную воду и этиловый 96- градусный спирт. Коэффициент абсолютного поверхностного натяжения спирта (σ_x) равен 22,3 дин/см.

Измерение силы отрыва кольца от поверхности жидкости (спирта) (P_x) проводят, как описано выше в упражнении 1.

Упражнение 3. Определение коэффициентов поверхностного натяжения различных жидкостей. Описанным выше способом определяют поверхностное натяжение ацетона, бензола, глицерина.

Для каждого определения следует брать чистые часовые стекла, а платиновое кольцо прокалывать для очистки. Все жидкости, как и воду, можно исследовать в количествах 0,5 – 1 мл.

Пользуясь уравнениями (2.4) и (2.6) получают значения $Q_{истин}$ и $Q_{найден}$. Исходя из уравнения (2.5), можно выразить коэффициент поверхностного натяжения исследуемой жидкости:

$$\sigma_x = \sigma_{H_2O} \times Q_{истин} \quad (2.11)$$

Результаты измерений, относящиеся к упражнениям 1 и 3, заносятся в табл. 2.1.

Таблица 2.1

Жидкость	Сила отрыва кольца	Вес кольца с пленкой жидкости	Истинная сила отрыва	$Q_{найден}$	$Q_{истин}$	σ_x

Упражнение 4. Влияние поверхностно-активных веществ на поверхностное натяжение физиологического и рингеровского растворов. На часовое стекло помещают 0,5 мл рингеровского раствора для и определяют его силу отрыва (P) описанным выше способом. Расчёт результатов проводят по формуле (2.2). После этого к раствору на часовом стекле добавляют одну каплю 0,1%-ного раствора олеата натрия и тотчас же после добавления определяют силу отрыва кольца (P). Следующие определения отрыва кольца (P) производят через 1, 3, 5, 10, 15, 20 мин после начала эксперимента.

Аналогичным образом проводят опыт с физиологическим раствором. График строят по изменению истинной силы отрыва в течение времени.

На оси абсцисс откладывают время в минутах, на оси ординат – значения P силы отрыва в мг.

По результатам работы сделать выводы:

О причинах разницы величины поверхностного натяжения различных жидкостей.

О причинах наличия, отсутствия поверхностной буферности физиологического раствора и раствора Рингера.

Контрольные вопросы

1. Дать определение поверхностному натяжению.
2. Дать определение поверхностной буферности. Какие растворы обладают поверхностной буферностью и почему.
3. Для чего можно использовать метод определения поверхностного натяжения растворов в исследовательской практике?
4. Каков принцип действия ПАВ. Как человек применяет ПАВ в быту, хозяйственной и научной сферах деятельности?

РАБОТА 3. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ БЕЛКОВ НА ФИЛЬТРОВАЛЬНОЙ БУМАГЕ

В настоящее время для разделения белков используется метод электрофореза. Этот метод основан на том, что молекулы белков в растворе несут электрические заряды. Если через раствор пропускать электрический ток, поместив в него электроды, то молекулы в соответствии со своими зарядами будут двигаться к электродам. Под действием электрического тока молекулы различных белков перемещаются с различной скоростью. Пользуясь этим, можно разделять смесь белков на отдельные фракции. Электрофоретическое разделение является более точным по сравнению с химическим, применявшимся ранее.

Явление электрофореза было известно давно. В 1809 г. профессор Московского университета Рейс наблюдал, что частички глины, диспергированной в воде, движутся под действием электрического тока к аноду. Электрофорез или, как его еще называют, катафорез, есть перенос в электрическом поле коллоидных частиц. Передвижение коллоидных частиц под действием тока свидетельствует о том, что они несут определенные электрические заряды. Современная техника электрофореза сложных смесей белков и других веществ была разработана Тизелиусом в 1937 г. В дальнейшем техника электрофореза и сам электрофоретический аппарат все более совершенствовались.

В настоящее время сохранил свою актуальность метод электрофореза на фильтровальной бумаге. На фильтровальную бумагу, смоченную буферным раствором, наносят каплю раствора белка. Затем через эту полоску бумаги пропускают электрический ток. Белки перемещаются в электрическом поле с различной скоростью в зависимости от массы и заряда и распределяются в течение определенного времени на разном расстоянии между полюсами электрического поля. Таким образом, смесь белков разделяется на фракции. Известно несколько таких электрофоретических фракций белков кровяной плазмы. Они получили название альбуминов и глобулинов, причем различают α -, β - и γ -глобулины. α -, β -глобулины часто разделяются еще на более мелкие фракции α_1 -, α_2 -, α_3 - и β_1 -, β_2 -глобулины.

Конструкция прибора. Прибор состоит из электрофоретической камеры (ванны) и блока питания. В электрофоретической камере исследуемое вещество разделяется на фракции в электрическом поле, которое создается между угольными электродами, опущенными в буферный раствор.

Электрофоретическая камера представляет собой пластмассовую ванну, в которой имеются кюветы для буферного раствора, с двух сторон ее – контактные планки, на которых установлены угольные электроды и клеммы для под-

ключения ванны к блоку питания. Для соблюдения полярности на штепсельной вилке и штепсельных клеммах поставлены знаки «+» и «-». В ванне есть призмы для поддерживания электрофореграмм. Ванна закрывается пластмассовой крышкой с прозрачными окнами из органического стекла. Для установки ее в горизонтальном положении служат регулировочные винты. Конструкция электрофоретической камеры предусматривает отключение напряжения от ванны до снятия крышки.

Блок питания состоит из двух узлов: шасси и корпуса. На шасси расположены основные элементы электрической схемы прибора. К шасси крепится передняя панель, на которой находятся элементы контроля и регулирования тока и напряжения; миллиамперметр на 10 мА с надписью «mA×4»; вольтметр на 10 В с надписью «V×50»; сигнальная лампочка контроля включения прибора с надписью «Сеть»; выключатель с надписью «Включено» для включения прибора; ручка с надписью «Регулировка напряжения» для установки требуемой величины выходного напряжения.

На задней стенке блока питания установлены: клеммы со знаками «+» и «-» для подключения электрофоретической камеры; клемма «Земля»; держатель предохранителя и шнур с вилкой для включения приборов в сеть. Прибор обязательно нужно заземлить.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА

Для подготовки электрофоретической камеры к работе необходимо следующее.

1. Установить кюветы по обоим концам ванны и залить буферным раствором (по 50-60 мл в каждое отделение кюветы) так, чтобы угольные электроды были погружены в раствор.

2. Установить призмы в специальные гнезда ванны.

3. От конца хроматографической полоски на расстоянии 65 мм наметить простым карандашом линию старта. Смочить полоски в буферном растворе. Затем положить бумажные полоски (фореграммы) в ванну таким образом, чтобы концы их были погружены в буферный раствор. Рекомендуется фосфатный буферный раствор с рН 8,6.

4. Установить контактные планки в ванне так, чтобы угольные электроды опустились во внешние отделения кювет.

5. На линию старта микропипеткой нанести препарат белка в количестве 20-100 мкл. После внесения белкового раствора ванну плотно закрыть крышкой для сохранения постоянной влажности воздуха. При закрывании крышки проследить, чтобы отрицательный полюс приходился на линию старта.

6. Прибор включить в сеть. Установить напряжение 200-250 В. Электрофорез продолжать в течение 2 ч. После его окончания фореграммы вынуть из ванны и поставить в сушильный шкаф, где держать при температуре 105 - 110°C в течение 10 мин. При этой температуре белки коагулируют и фиксируются на том месте, которого достигли в процессе электрофореза.

7. Окрасить фореграммы бромфеноловым синим красителем. Окрашивать в течение 5 мин, а затем бумажные полоски промыть в растворе 7% уксусной кислоты. После этого полоски залить закрепителем на 1 – 2 мин и просушить в сушильном шкафу.

8. По окончании работы с камерой слить буфер из ванночек, промыть и очистить электроды, затем собрать снова всю камеру и закрыть ее крышкой.

По результатам работы сделать выводы:

О причинах разницы подвижности белков на электрофореграммах.

О количестве белковых фракций в исследуемых объектах.

Контрольные вопросы

1. В чем заключается принцип метода электрофореза?

2. Как применяется метод электрофореза для фундаментальных исследований?

3. Электрофорез как физиопроцедура. Каковы аспекты применения электрофореза медицине?

РАБОТА 4. НАБУХАНИЕ ТКАНЕЙ

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

Начальная стадия набухания сопряжена с образованием вокруг активных групп сольватной оболочки (активные группы находятся на поверхности коллоидных частиц). Образование такого мономолекулярного 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.

При набухании гель увеличивается в объеме и производит давление, которое называют давлением набухания; оно наиболее значительно в начальной стадии. Во время этого процесса изменяются и механические свойства гелей: модуль упругости набухающей ткани быстро падает. 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 коллоида (или ткани). Она зависит от сольватации мицелл, от эластичности геля, его прочности 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 - от температуры. Исследование кинетики набухания указывает, что этот процесс протекает по закону мономолекулярной реакции.

Протоплазма клеток и тканей хорошо набухает в воде и в водных растворах. При исследовании набухания тканей следует, однако, иметь в виду, что они содержат большое количество воды, а не являются сухими гелями. Поэтому приведенные выше закономерности могут быть перенесены на жидкую протоплазму лишь с большими оговорками. К тому же и природа сил, удерживающих воду в живом объекте, еще мало изучена и до настоящего времени служит предметом широких дискуссий. Общие закономерности процесса набухания, его степень и скорость определяются физико-химическими особенностями структуры самих тканей.

В жизнедеятельности организма набухание биокolloидов играет немаловажную роль и служит одним из факторов, регулирующих водный баланс кле-

ток и тканей. Степень набухания тканей зависит от их функционального состояния, но особенно резко меняется при патологических процессах (ожоге, воспалении, злокачественных образованиях). Значительное влияние на процесс набухания оказывает солевой состав среды, концентрация водородных ионов, коллоидно-осмотическое давление и действие многих других физико-химических факторов.

На скорость и на степень набухания гелей и тканей большое влияние оказывают анионы и катионы солей. Решающее значение принадлежит при этом анионам. В зависимости от способности усиливать набухание анионы можно расположить в нижеследующий ряд: $\text{CNS}^- > \text{J}^- > \text{Br}^- > \text{NO}_3^- > \text{ClO}_3^- > \text{Cl}^- > \text{ацетат}^- > \text{цитрат}^- > \text{тарtrat}^- > \text{SO}_4^{2-}$. Наибольшее набухание вызывают ионы CNS^- и наименьшее – ионы SO_4^{2-} .

Концентрация водородных ионов оказывает на набухание тканей очень большое влияние: подкисление или подщелачивание среды (до определенного предела) вызывает увеличение степени набухания, при дальнейшем увеличении кислотности или щелочности среды степень набухания уменьшается. В частности, при воспалительных процессах увеличение концентрации водородных ионов и повышение осмотического давления (происходящее вследствие распада белков и увеличения общего количества молекул) приводят к повышению степени набухания биокolloидов. Наименьшее набухание биологических тканей наблюдается в изоэлектрической и изокolloидно-осмотической точках.

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

Весовой метод изучения динамики набухания весьма неточен и в настоящее время уступает место другим методам – объемному методу с применением проекции на экран, титриметрическому методу и др. Однако весовой метод продолжает сохранять свое значение вследствие большой простоты. В частности, он может быть с успехом применен при сравнительном исследовании способности различных тканей к набуханию или для сравнительной оценки действия различных физико-химических агентов на одну и ту же ткань.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА

Упражнение 1. Исследование набухания различных тканей теплокровных. Для исследования берут кожу, скелетную (икроножную) мышцу и печень. Перед экспериментом взвешивают крючки, чтобы их вес не вносил искажение в результаты эксперимента. В дальнейшем вес крючка вычитают из веса ткани.

Препарированные кусочки ткани вместе с крючком (массой не более 150 мг) помещают в физиологический раствор NaCl (0,9%). Далее проводят взвешивание кусочков тканей через 5, 10, 20 минут от помещения их в раствор. Перед взвешиванием ткань слегка промокают фильтровальной бумагой, чтобы убрать избыточную влагу. Полученные результаты вносят в таблицу 4.1.

Упражнение 2. Определение влияния pH раствора на величину набухания мышечной ткани. Используют фосфатный буфер с pH 4,9 и 9,1. Буферные растворы приливают к физиологическому раствору NaCl из расчета 1 мл буферного раствора на 9 мл физиологического. В качестве контрольных значений используют результаты набухания мышечной ткани в физиологическом растворе из упражнения 1.

Ткани готовят в соответствии с указаниями в упражнении 1.

Опыт проводят с двумя кусочками икроножной мышцы, которые помещают соответственно в физиологический раствор с добавлением буферных растворов. Взвешивание тканей производят через 5, 10, 20 минут от помещения их в раствор. Перед взвешиванием ткань слегка промокают фильтровальной бумагой, чтобы убрать избыточную влагу.

В качестве контрольных значений используют результаты набухания мышечной ткани в физиологическом растворе из упражнения 1.

Полученные результаты вносят в таблицу 4.1.

Упражнение 3. Изучение влияния ионов кальция на величину набухания скелетной мышцы. Четыре кусочка икроножной мышцы помещают для набухания в бюксы, которые содержат физиологический раствор с добавлением 10%-ного раствора CaCl₂. Последний добавляют из расчета:

- 1) 0,2 мл на 5 мл физиологического раствора;
- 2) 0,4 мл на 5 мл физиологического раствора;
- 3) 0,6 мл на 5 мл физиологического раствора.

Опыт проводится описанным выше порядком.

В качестве контрольных значений используют результаты набухания мышечной ткани в физиологическом растворе из упражнения 1.

Полученные результаты вносят в таблицу 4.1.

Упражнение 4. Исследование набухания тканей в гипо- и гипертонических растворах. Для работы используют два раствора NaCl: 1) гипотонический – 0,2%-ный, 2) гипертонический – 2,0%-ный.

В качестве контрольных значений используют результаты набухания мышечной ткани и печени в физиологическом растворе из упражнения 1.

Прослеживают набухание скелетной мышцы и печени лягушки в этих растворах. Работу ведут описанным выше способом. Полученные в опыте данные записывают в таблицу 4.1.

Таблица 4.1

Ткань	Вес								
	Исходный		Через 5 минут после начала		Через 10 минут после начала		Через 20 минут после начала		
	мг	%	мг	%	мг	%	мг	%	

Кроме того, результаты каждого упражнения оформляются в виде графиков, на которых по оси абсцисс откладывают время, а на оси ординат – вес ткани в процентах по отношению к исходному весу, который принимается за 100%.

По результатам работы сделать выводы:

О разнице величины набухания различных тканей в изотоническом растворе.

О влиянии концентрации соли в растворе на величину набухания скелетной мышцы.

О влиянии pH раствора на величину набухания скелетной мышцы.

О влиянии ионов кальция на величину набухания скелетной мышцы и печени

Контрольные вопросы

1. Что понимают под степенью и скоростью набухания.
2. При каких условиях наблюдается наименьшее набухание биологических растворов.
3. Как влияет подкисление и подщелачивание на набухание тканей.
4. Как влияют на набухание тканей двухвалентные ионы.
5. Объяснить, как влияет на набухание изменение концентрации раствора.

РАБОТА 5. ОСМОТИЧЕСКОЕ ДАВЛЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЕЙ

Осмотическое давление – это такое давление любого раствора (в том числе и биологической жидкости), которым обладало бы растворенное вещество, если бы, находясь в газообразной фазе при той же температуре, оно занимало тот же объем, который занимает раствор.

Для достаточно разбавленных растворов осмотическое давление при постоянной температуре прямо пропорционально концентрации растворенного вещества и абсолютной температуре:

$$P = C \times R \times T \quad (5.1)$$

где P – осмотическое давление, атм;

C – его концентрация, моль/л;

T – абсолютная температура, °К;

R – газовая постоянная, равная $0,82 \text{ л} \times \text{атм.} \times \text{град.} \times \text{моль}^{-1}$.

Таким образом, из формулы следует, что осмотическое давление разбавленных растворов прямо пропорционально количеству частиц растворенного вещества.

Формула 7.1 приложима к любым достаточно разбавленным растворам, кроме растворов электролитов. В последних вследствие электролитической диссоциации происходит образование большого количества частиц растворенного вещества и соответственно – увеличение осмотического давления по сравнению с тем, какого следовало бы ожидать, исходя из наличной молекулярной концентрации.

Для определения осмотического давления существует ряд косвенных методов, основанных на зависимости между концентрацией раствора и давлением (или упругостью) его насыщенного пара. Под упругостью пара понимают то его давление, при котором пар находится в равновесии с жидкостью.

Наиболее распространенными методами определения осмотического давления являются методы криоскопии и эбуллиоскопии. Первый из них основан на определении понижения точки замерзания раствора чистого растворителя. Во втором исходят из повышения точки кипения раствора по отношению к чистому растворителю. Однако применение метода эбуллиоскопии связано с измерениями при высоких температурах, при которых сохранение биокolloидов невоз-

можно. Поэтому для целей биологического исследования метод эбуллиоскопии не пригоден. Существуют и другие методы, также основанные на понижении упругости пара раствора чистого растворителя.

Измерение величины осмотического давления можно производить и прямым путем при помощи приборов, называемых осмометрами. Принцип работы осмометра основан на измерении гидростатического давления столба жидкости, уравновешивающего осмотическое давление раствора. При этом раствор отделяют от растворителя специальной мембраной, не проницаемой для молекулы растворенного вещества. Определение осмотического давления вещества прямым путем наталкивается на принципиальные трудности, так как в действительности не существует идеальной полупроницаемой мембраны, пропускающей молекулы растворителя, но полностью задерживающей молекулы растворенного вещества. В настоящее время осмометры употребляют только для измерения коллоидно-осмотического давления.

Осмотическое давление водной среды и внутренней среды ряда низших организмов может колебаться в весьма широких пределах. Колебания осмотического давления в жидкостях и тканях низших организмов выражают степень приспособляемости организмов к постоянно меняющимся условиям внешней среды. У ряда высших организмов приспособление к колебаниям осмотического давления внешней среды связано с наличием сложных регуляторных механизмов, обеспечивающих относительное постоянство осмотического давления крови и тканей. Определяющая роль в этой регуляции принадлежит центральной нервной системе. В настоящее время удалось выявить наличие в соединительной ткани человека и животных специализированных нервных окончаний – интерорецепторов, воспринимающих колебания осмотического давления.

Плазмолиз – это отделение пристеночного слоя цитоплазмы от твердой оболочки растительной клетки вследствие утраты ею воды. Данный процесс обратим. Увеличение объема цитоплазмы до исходного уровня называют деплазмолизом.

Для плазмолиза используют гипертонический раствор физиологически безвредного вещества.

Динамика плазмолиза следующая: сначала этим процессом охватываются крайние клетки среза, а затем – остальные, протопласт сжимается и отходит от клеточных стенок.

Причина плазмолиза – диффузия воды через перегородку в сторону раствора с более высокой концентрацией из области раствора с более низкой концентрацией.

В клетках кожицы лука цитоплазма обладает большой вязкостью, поэтому сначала будет наблюдаться вогнутый плазмолиз: цитоплазма отстанет от кле-

точных стенок неравномерно (только в некоторых углах и на некоторых участках), а затем он перейдет в выпуклый плазмолиз. Причем цитоплазма в вытянутых, дифференциальных клетках может распадаться на несколько комочков, часто связанных между собой тяжами цитоплазмы. После слишком длительного (глубокого) плазмолиза деплазмолиз не происходит, т.к. нарушается проницаемость мембран. Для деплазмолиза необходимо заменить гипертонический раствор на гипотонический, или воду.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА

Упражнение 1. Определение осмотического давления методом Барджера-Раста. Один из контрольных и исследуемый растворы наливают на часовые стекла, а из стекол набирают в капилляр. Делают это следующим образом: капилляр погружают в один из растворов и дают жидкости подняться до середины высоты капилляра; перевернув капилляр, опускают жидкость к другому его концу и, когда между мениском и краем капилляра остается промежуток в несколько миллиметров, погружают этот конец капилляра в другой раствор; последний поднимается по капилляру, и пузырек воздуха оказывается приблизительно в середине капилляра. Для удобства запаивания на обоих концах капилляра можно оставить небольшие участки, не заполненные жидкостью.

Капилляр быстро и тщательно замазывают с обеих сторон менделеевской замазкой, которая должна в течение всего времени наполнения капилляров подогреться на малом пламени газовой горелки или на водяной бане. Для того чтобы замазка плотно пристала к наружным стенкам капилляра, они должны быть совершенно сухими. Поэтому перед запаиванием капилляр необходимо обтирать ватой или фильтровальной бумагой. Следует помнить, что большинство ошибок при работе по методу Барджера и Раста происходит именно из-за плохой запайки капилляров, поэтому к данной части работы нужно отнестись особенно внимательно.

Капилляр кладут на предметное стекло. Стекло с капилляром помещают на предметный столик микроскопа и наводят фокус на один из менисков жидкости или на оба, если пузырек воздуха мал и целиком умещается в поле зрения. Далее наблюдают за движением мениска жидкости в течение нескольких минут. Определив, в каком направлении движется мениск, решают, какой из растворов имеет большую концентрацию.

Результаты наблюдений записывают в таблицу 5.1.

Таблица 5.1

Контрольный раствор, %	Направление движения мениска исследуемого раствора	Исследуемый раствор
0,5	←	-
0,6	←	-
0,7	0	+
0,8	→	-

Растворы в течение всего опыта надо держать в закрытых сосудах и на часовое стекло наливать только непосредственно перед заполнением капилляра во избежание испарения воды и изменения концентрации раствора.

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. Только убедившись в том, что направление движения мениска во всех пробах соответствует ожидаемому, можно переходить к выполнению лабораторных работ.

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

Пример расчета. Согласно данным измерений исследуемый раствор имеет осмотическую концентрацию, соответствующую 0,45%-ному раствору NaCl. Температура во время измерений равнялась +37°.

Молярный раствор NaCl содержит 58,5 г этой соли в 1 л воды. Следовательно, 0,45 %-ный раствор NaCl соответствует $0,45/58,5 = 0,0077$ молярного раствора.

Подставляя вычисленное значение для С в формулу (5.1) и помня, что каждая молекула NaCl образует два иона, находим

$$P = 2 \times 0,0077 \times 0,82 \times (273,15 + 37) = 3,917 \text{ атм.}$$

Упражнение 2. Наблюдение за плазмолизом и деплазмолизом в клетках чешуи лука. Приготовить препарат кожицы чешуи лука. Протереть предметное стекло. Пипеткой на предметное стекло поместить 1-2 капли воды. Снять кожицу с белой чешуи лука и поместить в каплю воды на предметное стекло. Расправить кожицу препаровальной иглой. Накрыть препарат покровным стеклом так, чтобы под ним не осталось пузырьков воздуха. На предметное стекло вплотную к покровному стеклу нанести каплю раствора поваренной соли. С противоположной стороны покровного стекла, также вплотную к нему, поместить полоску фильтрованной бумаги, которой оттягивается вода до тех пор, пока раствор соли, войдя под покровное стекло, полностью не заместит ее. Наблюдать за явлением

плазмолиза в течение 20 минут. Определить время, в течение которого начинает наблюдаться эффект. Провести эксперимент для следующих растворов поваренной соли: 2,5 5,0 10,0% Полученные результаты внести в таблицу 5.2.

Таблица 5.2

Концентрация раствора поваренной соли, %	Время, через которое были зафиксированы первые признаки плазмолиза, мин	Время, через которое были зафиксирован полный деплазмолиз, мин

В тетради зарисовать клетки, в которых прошёл плазмолиз.

Не снимая покровного стекла, оттянуть фильтрованной бумагой плазмолизирующий раствор и заменить его водой. Наблюдать деплазмолиз. Определить время, через которое происходит полный деплазмолиз.

По результатам работы сделать выводы:

- О концентрации соли исследуемого раствора.
- О величии осмотического давления исследуемого раствора.
- О зависимости скорости протекания плазмолиза от концентрации раствора соли.
- О зависимости скорости протекания деплазмолиза от концентрации плазмолизирующего раствора.

Контрольные вопросы

1. Что такое осмотическое давление? Понятие гипер-, гипо-, и изотонических растворов для теплокровных и холоднокровных животных.
2. Что такое онкотическое давление раствора? Роль онкотического давления в формировании процесса воспаления.
3. Что такое плазмолиз и деплазмолиз?
4. Принципы определения осмотического давления. Криоскопический метод. Эбулиоскопический метод. Метод Барджера-Раста.

РАБОТА 6. БИОЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ ПОТЕНЦИАЛЫ

Многие процессы жизнедеятельности, как животных, так и растительных организмов, сопровождаются возникновением электродвижущих сил в клетках и тканях - появлением биоэлектрических потенциалов. Величина биопотенциалов обычно не превышает 50 – 150 мВ. Кажущееся исключение составляют только биопотенциалы электрических органов рыб, разряды которых достигают нескольких сот вольт. Однако разряд электрического органа представляет собой сумму разрядов множества последовательно соединенных элементарных ячеек, тогда как в каждой отдельной ячейке электродвижущая сила не превышает 100 – 150 мВ.

Биопотенциалы сильно отличаются друг от друга по своей продолжительности. Время, за которое амплитуда биопотенциала нарастает от нуля до максимальной величины, колеблется в разных случаях от долей миллисекунды до многих минут и часов. Следовательно, диапазон частотных характеристик биопотенциалов, выраженных в герцах, простирается приблизительно от 0 до 10 кГц.

Многообразие биоэлектрических потенциалов заставляет стремиться к созданию их четкой классификации. Однако создать такую классификацию очень трудно, и в настоящее время единой общепринятой классификации биопотенциалов еще нет.

Более рациональной представляется сейчас классификация, способная отразить связь биопотенциалов с процессами, протекающими в живых организмах. Такая классификация была предложена советским ученым Д.Л. Рубинштейном. Согласно этой классификации различают три основные группы биоэлектрических потенциалов: 1) метаболические; 2) покоя или повреждения (демаркационные); 3) действия. Каждой из этих групп потенциалов присуща определенная связь с конкретными биологическими процессами.

К группе метаболических потенциалов относятся стационарные, постоянные во времени разности потенциалов, которые устанавливаются между участками тканей, характеризующимися различными уровнями интенсивности обмена веществ. Примерами метаболических потенциалов могут служить разности потенциалов между верхушкой стебля и корнем растений, потенциал фотосинтеза и т.д.

К демаркационным потенциалам относятся потенциалы, возникающие между интактным и поврежденным участками клетки или ткани и разности потенциалов между наружной поверхностью и внутренним содержимым клеток. При этом, как правило, поврежденный участок и внутренняя часть клетки оказыва-

ются электроотрицательными по отношению соответственно к неповрежденному участку и наружной поверхности клеток.

Потенциалы действия – это колебания электрической активности, происходящие при возбуждении живой ткани и переходе ее в состояние активной деятельности. При этом разность потенциалов возникает между возбужденным и невозбужденным участками органа или ткани, причем возбужденный участок оказывается электроотрицательным по отношению к невозбужденному. Возникновение потенциала действия всегда сопровождается распространением волны возбуждения и, по представлению ряда авторов, сам потенциал действия служит причиной распространения возбуждения по специализированным возбудимым образованиям – нервам и мышцам.

К биоэлектрическим потенциалам, возникающим в клетках и тканях, относятся потенциалы ионной природы – собственно биоэлектрические потенциалы и окислительно-восстановительные потенциалы. Собственно биоэлектрические потенциалы обусловлены неравномерным распределением ионов в различных участках клеток и тканей, т.е. асимметрией распределения ионов.

Характер асимметрии, обуславливающей появление разности потенциалов в биологических системах, соответствует в основном трем типам неравномерного распределения ионов в физико-химических системах. К первому из них относятся диффузионные потенциалы, возникающие при наличии жидкостного контакта между растворами, отличающимися друг от друга разной подвижностью ионов. Ко второму типу принадлежат мембранные потенциалы, появление которых обусловлено наличием мембраны, ограничивающей подвижность некоторых ионов. Третий тип представлен фазовыми потенциалами, возникающими на границе двух фаз, например: на границе водного раствора электролита и не смешивающегося с водой растворителя.

Другую группу потенциалов, отводимых от клеток и тканей, составляют так называемые окислительно-восстановительные потенциалы. Их возникновение обусловлено неравномерным распределением электронов между участками тканей, отличающихся друг от друга в основном интенсивностью дыхательных и гликолитических процессов, при которых происходит присоединение и отдача электронов молекулами биосубстрата.

Удобным методом определения электродвижущей силы биологических объектов является компенсационный метод. В этом случае ЭДС биологического объекта уравнивается встречной ЭДС какого-либо физического источника – аккумулятора или батареи.

Компенсационная схема для измерения ЭДС состоит из двух цепей: большой цепи – цепи источника, ЭДС которого известна, и малой цепи – цепи исследуемого источника ЭДС. В малую цепь включают гальванометр (нулевой при-

бор). Пользуясь магазином сопротивлений, к которому оба источника ЭДС подключены одноименными полюсами, находят такое положение, при котором ток в малой цепи отсутствует. Об отсутствии тока судят по нулевому положению стрелки гальванометра.

Потенциометр представляет собой набор двух магазинов сопротивлений для компенсации. При работе с компенсационными схемами во время измерения ЭДС необходимо строго соблюдать полярность включения исследуемого объекта.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА

Упражнение 1. Измерение мембранного потенциала кожуры картофеля или яблока. На дно кристаллизатора наливают раствор KCl 0,01 н. Кожура на погруженной в раствор части картофеля должна быть неповрежденной. Измеряют разность потенциалов в системе и прослеживают в течение 30-40 мин, изменяется ли потенциал во времени или остается стабильным. Измерения проводят каждые 5 минут.

Далее раствор KCl 0,01 н в кристаллизаторе заменяют на раствор KCl 0,001 н. Для того чтобы не разбирать установку, раствор отсасывают из кристаллизатора пипеткой. Определяют величину разности потенциалов в системе сразу после замены раствора, затем через 5 и через 10 минут.

После этого вновь заменяют раствор KCl 0,001 н на раствор KCl 0,01 н и проверяют, вернулась ли величина потенциала к исходному значению.

Результаты опыта наносят на график, откладывая по оси абсцисс время, а по оси ординат – величину потенциала в милливольтгах, и отмечают стрелками моменты смены растворов.

Упражнение 2. Измерение мембранной разности потенциала кожицы столетника. Собирают установку, как и в предыдущем упражнении. Лист столетника срезают у основания и помещают в кристаллизатор с раствором KCl 0,01 н. Конец сифончика прикладывают к поперечному срезу листа и слегка вдавливают в мякоть. Определяют величину потенциала и прослеживают ее изменение в течение 10-15 мин, проводя измерение каждые 5 мин. После этого заменяют раствор в кристаллизаторе на раствор KCl 0,001 н (замену раствора производят тем же порядком, что и в предыдущем упражнении) и прослеживают изменение величины потенциала в течение 10 минут. Затем ножницами или скальпелем делают небольшой надрез на кожице той части листа, которая погружена в раствор. Разрез делают быстро, но осторожно, чтобы не нарушить целостность контактов всей системы. Определяют величину потенциала сразу по-

сле нанесения разреза. Далее измеряют величину потенциала каждые 5 мин в течение 30–40 минут

Результаты опыта наносят на график так же, как и в предыдущем упражнении.

По результатам работы сделать выводы:

- О причинах возникновения разности потенциалов в исследуемых объектах.
- О причинах изменения биопотенциалов при смене растворов.
- О природе возникающих биопотенциалов.

Контрольные вопросы

1. Чем отличаются электрохимические и биопотенциалы.
2. Какова классификация биопотенциалов
3. В чем принцип работы компенсационного метода измерения потенциалов.

РАБОТА 7. ПРОНИЦАЕМОСТЬ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ

Проницаемостью называется способность клеток и тканей пропускать газы, воду и растворимые в ней вещества. Проблема проницаемости имеет важное значение для вопросов обмена веществ, распределения веществ между клеткой и средой, для патологии и фармакологии. В основе проникновения веществ в клетки и ткани лежит явление диффузии, описываемое законом Фика. По этому закону скорость диффузии определяется количеством вещества, продиффундировавшего за единицу времени, она прямо пропорциональна концентрационному градиенту и площади поверхности, перпендикулярной к направлению диффузии, т.е.

$$\frac{dm}{dt} = -D \times S \frac{dc}{dx} \quad (7.1)$$

где m – количество вещества, г;

t – время, сек;

S – площадь поверхности, см²;

D – коэффициент диффузии, см² × с⁻¹;

c – концентрация вещества, г × см⁻³;

x – расстояние от начальной точки диффузии, см.

Для сферических частиц, превышающих не более чем на два порядка размеры молекул растворителя, коэффициент диффузии, согласно А. Эйнштейну, равен:

$$D = \frac{RT}{6N\pi r \eta} \quad (7.2)$$

По аналогии с формулой (6.1) для характеристики скорости проникновения вещества из внешней среды в клетку была предложена формула:

$$\frac{dm}{dt} = -PS(c - c_1) \quad (7.3)$$

где c – начальная концентрация вещества, г × см⁻³;

c_1 – концентрация вещества в момент наступления диффузионного равновесия, $г \times см^{-3}$;

S – площадь поверхности клетки, $см^2$;

P – константа проницаемости, представляющая собой величину, обратную тому сопротивлению, которое встречает диффундирующая частица при переходе из внешней среды в клетку или ткань.

В соответствии с формулами (7.1) и (7.2) скорость диффузии (и соответственно – проникновения) должна экспоненциально уменьшаться по мере падения концентрационного градиента во времени и выравнивания встречных диффузионных потоков. Однако в действительности скорость проникновения в клетку того или иного вещества, как правило, никогда не падает, а поддерживается на постоянном уровне. Последний зависит как от внешних условий (в частности, от концентрации вещества, во внешней среде), так и от интенсивности обмена веществ, вовлекающего в свой круговорот молекулы проникающего вещества. Если какое-либо вещество, проникая в клетку, вступает в химическую реакцию или изменяет свое физико-химическое состояние, то скорость его проникновения в двух взаимно противоположных направлениях окажется неодинаковой. Подобное явление называется односторонней проницаемостью.

Согласно Рубинштейну, неравномерное распределение веществ между клеткой и средой, а также между различными слоями тканевых мембран может быть обусловлено либо движением вещества против концентрационного градиента, но по какому-либо другому градиенту, либо движением вещества по градиенту активности, но с преимущественным прохождением в одном направлении. В основе последнего явления лежит: а) неодинаковое численное значение физико-химических параметров, характеризующее тканевую мембрану в направлении диффузионного потока (рН, редокс-потенциала, адсорбционного уровня), и б) физико-химическая лабильность молекул проникающего вещества. Если различным фазам протоплазмы как микрогетерогенной системы (или различным слоям тканевой мембраны) присущи различные значения тех или иных физико-химических переменных и если этим значениям соответствуют различные физико-химические состояния проникающего вещества (недиссоциированные молекулы – ионы, окисленная – восстановленная форма, адсорбированное – не адсорбированное состояния), то мы вправе ожидать движения веществ преимущественно в одном направлении.

Для экспериментальной проверки сделанных предположений удобным объектом является кожа лягушки, обладающая выраженной односторонней проницаемостью для ряда цветных индикаторов и других слабых органических

электролитов и, в частности, для красителей группы тиазинов (метиленовый синий, толуидиновый синий, тионин).

Чтобы выяснить, соответствует ли асимметричное распределение красителя в коже констатированной в опыте односторонней проницаемости в направлении от соединительной ткани к эпителию, проводилось исследование срезов кожи лягушки, полученных при помощи замораживающего микротомы и окрашенных указанными выше красителями. Было установлено асимметричное распределение этих красителей в коже: локализация окраски в эпителиальных слоях и клетках желез и ее отсутствие в соединительной ткани. Аналогичную картину удалось выявить и при гистологическом анализе нормального (обращенного эпителием наружу) и вывернутых мешков, приготовленных из кожи лягушки и наполненных 0,05%-ным раствором метиленовой синей на физиологическом растворе NaCl. И в этом случае окрашенным оказывался только эпителий, тогда как соединительная ткань оставалась неокрашенной. Очевидно, односторонняя проницаемость кожи лягушки для перечисленных выше красителей обусловлена различием адсорбционных уровней соединительной ткани и эпителия.

Таким образом, односторонняя проницаемость – прямое следствие физико-химической асимметрии тканевой мембраны, отражающее ее морфологическую и физиологическую дифференцировку. Адсорбционная асимметрия тканевых мембран, по-видимому, не единственная причина односторонней проницаемости: она может быть обусловлена неодинаковым значением других физико-химических переменных, в частности водородного показателя.

Окрашивание поперечных срезов кожи растворами цветных индикаторов (нейтральной красной, феноловой красной, метилового оранжевого) показало, что различные слои кожи имеют различные значения pH. Соединительная ткань характеризуется слабощелочной реакцией, а эпителий-слабокислой. Кислая реакция наиболее выражена у клеток кожных желез, секрет которых, по-видимому, ответствен и за кислую реакцию клеток эпителия.

Таким образом, деятельность желез активно поддерживает градиент pH вдоль оси кожной мембраны.

Различие активной реакции соединительных и эпителиальных слоев кожи определяет реакцию растворов с наружной и внутренней ее поверхностей. Действительно, если поместить нормальный и вывернутый мешки из кожи лягушки, заполненные физиологическим раствором NaCl, в раствор NaCl, то активная реакция наружного и внутреннего растворов сместится с pH 5,8 до 6,9 у эпителиальной поверхности и до 7,1 – у соединительной ткани. В последнем нетрудно убедиться, добавив к наружному и внутреннему растворам по две капли раствора цветного индикатора (нейтрального красного, фенолового красного, бромтимолового синего, бромкрезол пурпурного). Четкое различие окраски наружного

и внутреннего растворов наблюдалось в тех случаях, когда зона перехода индикатора лежала вблизи нейтральной реакции рН 7,0.

Следовательно, физико-химическое состояние молекул слабых электролитов (красителей, солей алкалоидов) различно как в разных слоях кожной мембраны, так и в растворах с разных ее сторон. В частности, в растворе, омывающем соединительную ткань, и в самой соединительной ткани слабые основания должны находиться преимущественно в виде недиссоциированных, а потому и более способных к диффузии молекул. Напротив, в растворе с низким рН, омывающем эпителий, да и в самих клетках эпителия должны преобладать ионы красителя, неспособные к диффузии, но зато легко связывающиеся внутри клеток.

Таким образом, благодаря градиенту рН в самой коже и между обоими омывающими ее растворами должен возникнуть определенный концентрационный градиент, обеспечивающий направленное движение красителя от соединительной ткани к эпителию.

При проникновении через кожу лягушки нейтрального красного уже спустя 30 мин после начала опыта эпителий нормального мешка окрашивается в ярко-красный цвет, соответствующий ионной форме красителя значительной концентрации. Краситель проникает в эпителий через соединительную ткань, в которой он находился в виде недиссоциированных диффузибельных молекул. Здесь налицо накопление красителя, перешедшего в менее диффузибельную ионную форму. В вывернутом кожном мешке остается окрашенным только эпителий. Однако он окрашен лишь слегка, так как находится в растворе ионов, уступающих по диффузибельности недиссоциированным молекулам.

Через 2 ч распределение красителя в нормальном мешке резко меняется. Окрашивается не только эпителий, но и соединительная ткань и при этом в строгом соответствии с активной реакцией каждого из слоев. В вывернутом мешке, напротив, окрашен только эпителий, так как попавшие в его клетки ионы как бы заперты в ловушку.

Односторонняя проницаемость отнюдь не является раз заданным присутствием мембране свойством. Произвольно изменяя активную реакцию раствора красителя, а также и солевого раствора, прилегающего к коже с противоположной стороны, можно усилить, ослабить, подавить одностороннее движение и даже изменить его направление на диаметрально противоположное.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА

Упражнение 1. Исследование односторонней проницаемости кожи лягушки для метиленового синего. Тщательно отмывую от слизи лягушку (жела-

тельно *Rana temporaria*) обезглавливают и обездвиживают, разрушая спинной мозг зондом. Осторожно надрезают кожу вокруг головы и снимают полностью. Кожу в нормальном ее положении (эпителием наружу) и в вывернутом положении (эпителием вовнутрь) натягивают на полые стеклянные цилиндры диаметром 10 мм. Предварительно перед натягиванием кожу во избежание ее разрыва, вызванного высыханием, смачивают физиологическим раствором NaCl изнутри и водой снаружи. Кожные мешки фиксируют на стеклянных цилиндрах с помощью ниток.

Приготовленные таким образом мешки наполняют физиологическим раствором, чтобы убедиться в их герметичности. После этого физиологический раствор выливают из мешков и наполняют каждый из них 1,5 — 2 мл 0,05%-ным раствором красителя.

Каждый из мешков погружают в бюкс, предварительно наполненный 20-25 мл физиологического раствора NaCl. При погружении следят за тем, чтобы уровень физиологического раствора в бюксе и уровень раствора красителя в цилиндре совпали друг с другом. Фиксируют положение цилиндра с прикрепленным к нему кожным мешком на бортах бюкса при помощи кольца, свитого из проволоки.

Бюксы с кожными мешками помещают на два часа в термостат, предварительно отрегулированный на 37°C. По прошествии указанного срока вынимают бюксы из термостата. Записывают результаты.

Упражнение 2. Влияние активной реакции раствора на одностороннюю проницаемость кожи для нейтрального красного. Буферные смеси с разными рН добавляют к раствору красителя из расчета 1 мл смеси к 2 мл раствора красителя. Заполняют мешки раствором красителя, предварительно забуференного смесью фосфатного буфера. Закрепив кожные мешки на стеклянных цилиндрах, погружают их в налитые бюксы и предварительно забуференные растворы NaCl (добавление буфера происходит из расчёта 1 мл буфера к 2 мл NaCl). Надлежит использовать следующие сочетания значений активной реакции наружного раствора и раствора красителя:

Наружный раствор	Раствор красителя
5,3	5,3
5,3	8,0
8,0	5,3
8,0	8,0

Бюксы с кожными нормальными и вывернутыми мешками, наполненными забуференными растворами красителя и погруженными в забуференные растворы NaCl, помещают в термостат с температурой, равной 37°C. По прошествии 2 часов бюксы вынимают из термостата.

Результат записывают таким же образом, как и в упражнении 1. Анализируют влияние рН на одностороннюю проницаемость.

По результатам работы сделать выводы:

Об условиях и причинах односторонней проницаемости кожи лягушки.

О зависимости проницаемости кожи лягушки для красителей от различных рН

Контрольные вопросы

1. Чем объясняется односторонняя проницаемость кожи лягушки.
2. Как изменение значений водородного показателя отразится на односторонней проницаемости.
3. Какие физико-химические факторы могут изменить одностороннюю проницаемость мембраны.
4. В чем разница между диффузией и проницаемостью.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1. ПРАВИЛА РАБОТЫ В ХИМИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ

1. Работать в лаборатории разрешается только в халатах.
2. Длинные волосы должны быть подобраны.
3. Все процедуры при выполнении работы можно проводить только на своем рабочем месте или в вытяжном шкафу.
4. При возникновении каких-либо неясностей работу прекратить и обратиться за разъяснением к преподавателю или лаборанту.
5. В процессе работы все флаконы с реактивами должны находиться на отведенных для них местах.
6. Необходимо соблюдать осторожность при работе с кислотами и щелочами.
7. Запрещается отмеривать реактивы путем всасывания ртом в пипетку.
8. Запрещается закрывать пальцем отверстия пробирок и колб при взбалтывании растворов.
9. При нагревании пробирки в пламени горелки следить, чтобы отверстие пробирки не было направлено на кого-либо из работающих. Во избежание выброса содержимого из пробирки нагрев производить постепенно, постоянно встряхивая ее и периодически вынимая из пламени. Во избежание ожогов и поражений от брызг и выбросов не следует наклоняться над сосудом, в который налита какая-либо жидкость.
10. Пролитый реактив немедленно удалить со стола.
11. При попадании на кожу кислоты или щелочи необходимо тотчас же пораженный участок обильно промыть водой, обработать нейтрализующими веществами: 2 %-ным раствором бикарбоната натрия или 2 %-ным раствором уксусной кислоты.
12. Запрещается принимать пищу в лаборатории.
13. Запрещается трогать и включать приборы без разрешения преподавателя.
14. После окончания работы показать преподавателю результаты эксперимента и, получив разрешение на окончание работы, привести в порядок свое рабочее место.
15. Использованную посуду освободить от содержимого, сполоснуть и сдать лаборанту.

ПРИЛОЖЕНИЕ 2. ТРЕБОВАНИЯ К ОФОРМЛЕНИЮ ЛАБОРАТОРНЫХ РАБОТ

Лабораторные работы оформляются на двойных листочках формата А5. В том случае, если одного двойного листочка не хватает, то к нему последовательно прикрепляют необходимое количество двойных листочков.

Лабораторная работа подписывается на первом листочке сверху (Фамилия И. Группа/подгруппа).

Лабораторные работы должны быть пронумерованы по порядку их выполнения.

Требования к иллюстративному материалу:

1. Рисунки, схемы и графики, иллюстрирующие ход работы или результаты должны быть выполнены карандашом (возможно использование цветных карандашей).

2. Каждый рисунок схема или график должны быть подписаны и пронумерованы.

3. Каждый рисунок схема или график должен занимать не менее половины страницы.

4. Оси графиков и линии сетки таблиц должны быть выполнены карандашом строго по линейке.

5. Оси графиков должны быть подписаны.

В каждой лабораторной работе должно быть:

1. Название лабораторной работы.

2. Цель лабораторной работы.

3. Задачи лабораторной работы (в том случае, если упражнений несколько).

4. Ход работы.

5. Результаты работы с иллюстрациями (рисунки, таблицы, схемы, графики)

6. Выводы (вывод может быть единым для всей работы или сделан отдельно для каждого упражнения)

ПРИЛОЖЕНИЕ 3. РЕАКТИВЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Работа 1. Регистрация ионизирующих излучений

1. Пересчетная установка типа Б
2. Секундомер

Работа 2. Поверхностное натяжение

1. Крутильные торсионные весы.
2. Подъемный столик с кремальерой.
3. Часовые стекла.
4. Платиновые кольца.
5. Пинцеты.
6. Спиртовки.
7. Пипетки на 1 мл.
8. Дистиллированная вода.
9. Этиловый спирт (95-96%).
10. Бутиловый спирт/Изобутиловый спирт.
11. Изопропиловый спирт.
12. Ацетон.
13. Этилацетат.
14. Глицерин.
15. Физиологический раствор NaCl (9 г NaCl растворить в 1 л)
16. Раствор Рингера. На 1 л H₂O: NaCl – 9 г, KCl – 0,45 г, CaCl₂ – 0,25 г, NaHCO₃ – 0,15 г, MgCl₂ – 0,25 г.
17. 0,1%-ный раствор олеата натрия.

Работа 3. Электрофорез белков на фильтровальной бумаге

1. Камера для электрофореза с блоком питания.
2. Полоски хроматографической (фильтровальной) бумаги 270 мм × 25

мм.

3. Ёмкости для окрашивания.
4. Растворы белков: яичный альбумин (разведение в 100 раз), сыворотка крови, сыворотка молока, желатина (0,5% раствор).
5. Фосфатный буфер рН 8,6. Подготовить раствор А (0,07 М однозамещённого фосфата калия KH_2PO_4 – 9,078 г в 1 л) и раствор Б (0,07 М двузамещённого фосфата натрия Na_2HPO_4 – 11,876 г в 1 л). Смешать растворы А и Б в соотношении 1 : 99. Довести рН до нужного значения фосфорной кислотой или калиевой щелочью.
6. Раствор бромфенолового синего. На 1 л H_2O : 0,1 г бромфенолового синего, 50 мл ледяной уксусной кислоты, 50 г – ZnSO_4 .
7. 7% раствор уксусной кислоты
8. Раствор закрепителя. На 1 л H_2O : 20 г ацетата натрия, 100 мл ледяной уксусной кислоты.

Работа 4. Набухание тканей

1. Весы торсионные
2. Чашки Петри.
3. Препаровальные ножницы.
4. Пинцеты.
5. Проволочные крючки.
6. Фильтровальная бумага.
7. Бюксы на 10 - 15 мл,
8. Мерные цилиндры на 10 - 15 мл
9. Пипетка на 1 мл.
10. Физиологический раствор NaCl для теплокровных (0,9%)
11. Гипотонический раствор NaCl (0,2%),
12. Гипертонический раствор NaCl (2,0%).
13. Раствор CaCl_2 (10%).
14. Фосфатный буфер рН 9,1. Подготовить раствор А (0,07 М однозамещённого фосфата калия KH_2PO_4 – 9,078 г в 1 л) и раствор Б (0,07 М двузамещённого фосфата натрия Na_2HPO_4 – 11,876 г в 1 л). Смешать растворы А и Б в

соотношении 1 : 99. Довести рН до нужного значения фосфорной кислотой или калиевой щелочью.

15. Фосфатный буфер рН 4,9. Подготовить раствор А (0,07 М однозамещённого фосфата калия KH_2PO_4 – 9,078 г в 1 л) и раствор Б (0,07 М двузамещённого фосфата натрия Na_2HPO_4 – 11,876 г в 1 л). Смешать растворы А и Б в соотношении 99 : 1. Довести рН до нужного значения фосфорной кислотой или калиевой щелочью.

16. Образцы тканей печени, мышцы и кожи курицы.

Работа 5. Осмотическое давление биологических жидкостей

1. Микроскоп
2. Капилляры
3. Растворы NaCl с концентрацией 0,3 0,4 0,5 0,6 0,7 0,8 0,9 1,0 1,5 2,0 2,5 3,0 5,0 10,0%
4. Дистиллированная вода
5. Электрическая плитка
6. Менделевская замазка или сургуч
7. Предметные стёкла
8. Покровные стёкла
9. Лук

Работа 6. Биоэлектрические потенциалы

1. Растворы KCl с концентрацией 0,01 н и 0,001 н
2. Сифоны, заполненные 2% агар-агаром, приготовленном на насыщенном растворе KCl
3. Яблоко или картофель.
4. Столетник (алоэ).
5. Потенциометр.
6. Каломельные электроды.

Работа 7. Проницаемость тканей

1. Набор препаровальных инструментов
2. Препаровальная ванна
3. Булавки
4. Бюксы
5. Полые стеклянные цилиндры
6. Нитки
7. 0,9%-ный раствор NaCl
8. Фосфатный буфер pH 8,0
9. Фосфатный буфер pH 5,3
10. Нейтральный красный, 0,125%-ный, приготовленный на физиологическом растворе
11. Метиленовый синий, 0,5%-ный, приготовленный на физиологическом растворе.

ВОПРОСЫ ДЛЯ ПРОМЕЖУТОЧНОЙ АТТЕСТАЦИИ

1. Биофизика как наука: цели, задачи, предмет, объект исследований. Классификация разделов биофизики в зависимости от размеров исследуемого объекта. Методологическая база разделов биофизики.
2. История развития биофизики. Вклад отечественных и зарубежных учёных в развитие биофизики.
3. Классификация термодинамических систем. Их параметры. Изолированная система – идеальная модель.
4. Термодинамическое равновесие закрытых и изолированных систем. Стационарное состояние открытых систем. Основные отличия.
5. Ход реакций в закрытых и открытых системах. Роль ферментов.
6. Экзергонические и эндергонические процессы. Понятие потенциала и разности потенциалов. Энергетическое сопряжение.
7. Основные постулаты термодинамики.
8. Первый закон термодинамики. Опыты Лапласа и Лавуазье. Закон Гесса как следствие первого закона термодинамики. Тепловая энергия – как эквивалент всех видов энергии.
9. Работа как процесс преобразования энергии. Преобразование энергии в закрытых системах. Деградация энергии в открытых системах.
10. Энтальпия. Изменение энтальпии в экзотермических и эндотермических реакциях. Виды теплообмена.
11. Понятие энтропии. Связь энтропии с упорядоченностью системы. Роль энтропии в жизнедеятельности организмов.
12. Второй закон термодинамики в приложении к живым системам. Уравнение Пригожина.
13. Свободная энергия Гиббса. Уравнение Гиббса-Геймгольца как математическое объяснение протекания реакций. Энтальпийные и энтропийные процессы.
14. Специфика биомеханики живых организмов. Понятие статики и динамики в живых организмах.

15. Принципы молекулярного узнавания Крейна на примере биологических систем.
16. Нековалентные взаимодействия в живых системах. Потенциал Ленарда-Джонса.
17. Гидрофобный эффект, как фактор направляющий процессы фолдинга биомолекул и формирование мембран. Изменение энтропии.
18. Классификация аминокислот по физико-химическим свойствам радикалов.
19. Первичная структура белка. Явление резонанса как причина прочности пептидной связи.
20. Спиральные виды вторичной структура белка. Спираль 4_{13} и 3_{10} Пролиновая спираль. Условия формирования.
21. Складчатые виды вторичной структуры белка.
22. Надвторичные структуры белка. Мотивы. Цинковый палец. Лейциновая застёжка-молния.
23. Изопериметрические задачи в биофизике. Форма третичной структуры белка. Кривая Фишера.
24. Условия формирования четвертичной структуры белка. Роль водной среды и гидрофобного эффекта.
25. Вторичная структура нуклеиновых кислот. Конформации, их характеристики и роль. Стеккинг взаимодействия.
26. Фолдинг и денатурация нуклеиновых кислот и белков. Баланс энтропии. Уравнение зависимости температуры плавления от состава ДНК.
27. Строение мембран клеток и их функции. Жидкостно-мозаическая модель мембран.
28. Химический состав биологических мембран. Связи между частями мембран.
29. Мембрана как конденсатор. Поведение мембраны в электрическом поле.
30. Метод исследования проницаемости мембран.
31. Типы пассивного транспорта веществ через клеточные мембраны. Роль градиентов.
32. Понятие градиента и его роль в направлении протекания

процессов.

33. Схема активного и пассивного транспорта. Их отличие.

34. Энергетика активного транспорта ионов через мембрану. Модель работы Na^+ - K^+ -АТФазы.

35. Понятие биопотенциалов. Классификация. Потенциал покоя и потенциал действия. Роли ионов натрия и калия в генерации потенциала действия в гигантском аксоне кальмара.

36. Механизм передачи электрического импульса по нервному волокну. Роль миелиновых оболочек.

37. Митохондриальная цепь переноса электронов. Принцип работы. Энергетика процесса.

38. Методы обнаружения и регистрации радиоактивных изотопов.

39. Строение атома и атомного ядра. Электроны, протоны, нейтроны. Изотопы, изотоны и изобары.

40. История открытия радиоактивности. Стабильные и радиоактивные изотопы. Их применение в биологических исследованиях.

41. Характеристика α -излучения, первое правило смещения.

42. Характеристика β -излучения, второе правило смещения.

43. γ -излучение. Рентгеновское излучение. Тормозная и характеристическая составляющие рентгеновского излучения.

44. Понятие об активности радиоактивных изотопов. Единицы измерения радиоактивности.

45. Закон радиоактивного распада (математическое выражение, графическое представление). Константа распада. Период полураспада. Средняя продолжительность жизни атомов радиоактивных изотопов.

46. Применение радиоактивных изотопов в качестве меченых атомов в биологических исследованиях. Применение меченых атомов в биологии, медицине и в сельском хозяйстве.

47. Принцип работы счетной трубки на примере ионизационной камеры.

48. Поверхностное натяжение различных жидкостей. Механизм возникновения поверхностного натяжения на границе раздела 2 сред.

49. Поверхностное натяжение. Поверхностная буферность.
50. Электрофорез. Применение в биологических и смежных исследованиях.
51. Электрофорез. Прикладные аспекты в медицине.
52. Набухание тканей. Влияние состава ионов окружающей среды на набухание тканей.
53. Набухание тканей. Методы изучения проницаемости веществ в клетки.
54. Набухание тканей. Зависимость набухания тканей от рН раствора.
55. Осмотическое давление и методы его регистрации. Онкотическое давление.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Антонов В.Ф. *Биофизика*. – М.: Владос, 2006. – 287 с.
2. Волькенштейн М.В. *Биофизика*. – СПб.: Лань, 2008. – 594 с.
3. Тарусов Б.Н., Антонов В.Ф., Бурлакова Е.В. *Биофизика*. М., 1968.
4. Рубин А.Б. *Биофизика*. М., 2000.
5. *Биофизика* / Г. А. Плутахин, А. Г. Коцаев. – М.: Лань, 2012. – 240 с.

ОГЛАВЛЕНИЕ

РАБОТА 1. МЕТОДЫ РЕГИСТРАЦИИ РАДИОАКТИВНЫХ ИЗЛУЧЕНИЙ.....	3
РАБОТА 2. ПОВЕРХНОСТНОЕ НАТЯЖЕНИЕ	13
РАБОТА 3. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ БЕЛКОВ НА ФИЛЬТРОВАЛЬНОЙ БУМАГЕ	21
РАБОТА 4. НАБУХАНИЕ ТКАНЕЙ	24
РАБОТА 5. ОСМОТИЧЕСКОЕ ДАВЛЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЕЙ.....	28
РАБОТА 6. БИОЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ ПОТЕНЦИАЛЫ	33
РАБОТА 7. ПРОНИЦАЕМОСТЬ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ	37
ПРИЛОЖЕНИЕ 1. ПРАВИЛА РАБОТЫ В ХИМИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ	43
ПРИЛОЖЕНИЕ 2. ТРЕБОВАНИЯ К ОФОРМЛЕНИЮ ЛАБОРАТОРНЫХ РАБОТ	44
ПРИЛОЖЕНИЕ 3. РЕАКТИВЫ И ОБОРУДОВАНИЕ	45
ВОПРОСЫ ДЛЯ ПРОМЕЖУТОЧНОЙ АТТЕСТАЦИИ.....	49
РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА	53

Учебно-методическое издание

МЕТОДИЧЕСКОЕ ПОСОБИЕ
К МАЛОМУ ПРАКТИКУМУ ПО БИОФИЗИКЕ

Издание седьмое

Составители:

Каневский Матвей Владимирович
Миронова Ирина Константиновна

Редактор В.А. Трушина
Технический редактор Л.В. Агальцова
Корректор Е.А. Малютина

Формат 60 X 84 1/16. Бумага офсетная. Гарнитура Таймс. Печать офсетная.
Усл. печ. л. 2,56 (2,75). Уч.-изд. л. 2,9. Тираж 300. Заказ №3#
Издательство Саратовского университета. 410026, Саратов, Астраханская,83.
Типография Издательства Саратовского университета. 410026, Саратов, Астраханская, 83.