Міністерство освіти і науки України
Вінницький національний технічний університет

Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт з дисципліни «Біофізика» для здобувачів вищої освіти за спеціальністю 163 – Біомедична інженерія





Developed in the frame of project "Erasmus+ (CBHE) BioArt "Innovative Multidisciplinary Curriculum in Artificial Implants for Bio-Engineering BSc / MSc Degrees" (586114-EPP-1-2017-1-ES-EPPKA2-CBHE-JP).

Вінниця
ВНТУ
2020

Лабораторна робота № 1
Кінетика біологічних процесів

Біологічна кінетика вивчає швидкість біологічних процесів і залежність їх від концентрації речовин, що беруть участь в біохімічних перетвореннях, а також від зовнішніх умов, зокрема, від температури. Така залежність зрозуміла, якщо врахувати, що будь-яка хімічна перетворення відбувається при умови зіткнень я молекул, які перебувають в хаотичному тепловому русі. За міру підвищення температури збільшується швидкість і довжина пробігу молекул і, отже, ймовірність їх зіткнення один з одним.

Таким чином, відносне кількість молекул, здатних вступати в реакції, тобто, активних молекул, з підвищенням температури збільшується, а сама швидкість реакції зростає.

Залежність швидкості процесу від температури відображає формула:

$$K = Ze^{-E/RT}, \qquad (1)$$

де K - константа швидкості; Z - число зіткнень між молекулами;
E - енергія активації; R - газова постійна; T - абсолютна температура.

Енергія активації відповідає рівню кінетичної енергії, якого повинна досягти частина молекул для здійснення реа кції, тобто пов'язана з кількістю активних молекул, здатних вступити в реакцію. Відносне кількість активних молекул відображає величина eE / RT в вищенаведеної формулі. Якщо прийняти чисельну значення газової Констан ти за 2, то кількість активних молекул при підвищенні температури на 10 °C збільшиться в 2 рази.

Величину, яка показує у скільки разів збільшується кількість активних молекул (а отже, і швидкість реакції) при підвищенні температури на 10 ° C, називають температурним коеффіці ентом і позначають символом Q_{10}

$$Q_{10} = \frac{VT_2}{VT_1}, \qquad (2)$$

де VT_1 - швидкість реакції при початковій температурі

VT_2 - швидкість реакції при збільшенні температури на 10 °

Між величиною температурного коефіцієнта реакції Q_{10} і тієї надлишкової енергією, якої повинні володіти молекули, щоб їх зіткнення привело до хімічної реакції (енергія активації - E), існує залежність, яка виражається формулою

$$E = 0{,}46T_1 \times T_2 \times \lg Q_{10}\,, \qquad (3)$$

де Е - енергія активації в ккал/моль;

T_1 і T_2 – температури, виражені в градусах абсолютної шкали і відрізняються один від одного на 10 ° С ($T_2 = T_1 + 10°$ С);

Даною формулою користуються і для обчислення енергії активації біологічних об'єктів, в тому числі секреції залоз, пульсації скорочувальних вакуолей найпростіших, скорочення м'язів і т.д.

Для обчислення енергії активації будь-якого біологічного процесу необхідно:

1) визначити його швидкість при двох температурах – T_1 и T_2;

2) обчислити величину Q_{10}, разделив величину скорости, полученную при T_2 на величину, полученную при T_1.

3) знайти енергію активації Е.

Обчислення температурного коефіцієнта і енергії активації процесу асиміляції вуглекислоти

Збільшення швидкості біологічних процесів добре можна спостерігати за кількістю бульбашок, що виділяються при зміні температури води в посудині з гілочкою елодеї.

Для досліду беруть велику пробірку і наливають в неї воду кімнатної температури. Вибирають свіжу гілочку елодеї і гострим лезом оновлюють зріз стебла у її основі. Це робиться для того, щоб звільнити міжклітинні ходи в стеблі і дати вільний вихід газам, що утворюються. Гілочку прив'язують ниткою до скляної палички так, щоб зрізаний кінчик був спрямований догори. Пробірку з гілочкою елодеї поміщають в термостат і виставляють на світло. При цьому з зрізаного кінця гілочки починають виділятися бульбашки газу. підраховують кількість бульбашок, що виділяються за одну хвилину. Такий підрахунок роблять кілька разів і визначають середнє арифметичне. Аналогічно підраховують кількість бульбашок, що виділяються при збільшенні температури на 10 ° С. Після визначення кількості бульбашок, які виділились при двох різних температурах, обчислюють Q_{10} і Е за вищенаведеними формулами.

Визначення температурного коефіцієнта і обчислення енергії активації скорочення серця жаби

Мета роботи: визначити зміну ритму скорочень серця жаби при різних значеннях температури і обчислити енергію його активації.

Свіжий препарат серця жаби прив'язують до скляної палички і поміщають в пробірку, заповнену раствором Рінгера кімнатної температури. Підраховують кількість скорочень серця, потім повторюють вимірювання при збільшенні температури на 10 ° С і зниженні на 10 ° С.

Підраховують середню кількість серцевих скорочень у хвилину при різних температурах і обчислюють значенняQ_{10} и Е.

Лабораторна робота № 2
ДОСЛІДЖЕННЯ ПОВЕРХНЕВОГО НАТЯГУ

Визначальну роль в властивостях тонких рідких плівок і капілярних явищах грають ван-дер-Ваальсові взаємодії. Під ван-дер-Ваальсовими взаємодіями розуміють взаємодії, мають флуктуаційна електромагнітне походження. Для цих взаємодій у багатьох випадках характерна універсальна залежність від відстані. Так енергія диполь-дипольної ван-дер-ваальсової взаємодії двох атомів назад пропорційна шостий ступеня відстані, а для атомів і поверхні конденсованої середовища - третій. Зростання потенціалу ван -дер-Вальсова взаємодій поблизу поверхні конденсованої фази, означає, що молекули в поверхневому шарі володіють додатковою енергією в порівнянні з молекулами всередині рідини. Надлишок вільної енергії ΔF , який припадає на одиницю площі поверхні розділу фаз ΔS, характеризується коефіцієнтом поверхневого натягу σ:

$$\boldsymbol{\sigma} = \Delta F/\Delta S \qquad (1)$$

Часто величину σ називають просто поверхневим натягом . величину. Величину $\boldsymbol{\sigma}$ вимірюють в **Дж/м2** або **Н/м**, чи **дин/см.**

На молекулу, що знаходиться всередині рідини, діють сили тяжіння з боку оточуючих її молекул, в сумі компенсуючі один одного. Молекула ж на поверхні притягується лише молекулами, що знаходяться знизу і з боків від неї, і не відчуває помітного впливу з боку молекул, що знаходяться зверху (пар). Н екомпенсірованность молекулярних сил в поверхневому шарі є причиною виникнення силового поля на поверхні розділу двох фаз. Рівнодіюча молекулярних сил на поверхні розділу НЕ дорівнює нулю і виявляється спрямованої всередину рідкої фази. Поверхня рідини поводиться як пружна мембрана. Для переходу молекул з внутрішніх шарів рідини на її поверхню (тобто для збільшення поверхні) вони повинні подолати сили взаємного тяжіння, що діють і межд у молекулами поверхневого шару. Тому перехід молекули з глибини рідини в поверхневий шар для збільшення поверхні пов'язаний з необхідністю здійснення роботи проти діючих в поверхневому шарі сил. Ця робота здійснюється молекулою за рахунок з Апасов її кінетичної енергії і йде на збільшення її потенційної енергії.

Робота (А), що витрачається на збільшення площі поверхні рідини, носить назву поверхневого натягу і визначається по формулі

$$A = S \times \delta, \qquad (2)$$

де S - площа поверхнs в $см^2$;

δ – коефіцієнт поверхневого натягу.

Таким чином, коефіцієнтом поверхневого натягу називається робота, яку потрібно зробити, щоб збільшити площу поверхні розділу на одиницю площі

поверхні. Відповідно, коефіцієнт поверхневого натягу вимірюють в ерг×см$^{-2}$.

Так як ерг - це дина×см, то ерг×см$^{-2}$ = см см$^{-2}$ = дина×см$^{-1}$, тобто коефіцієнт поверхневого натягу можна також висловити як силу, яку потрібно прикласти до периметру поверхні розділу для збільшення довжини периметра на одиницю довжини.

Прийнято розрізняти статичний і динамічний поверхневий натяг.

Динамічний поверхневий натяг (δ дин.) характеризує тільки що утворену поверхню розділу, склад якої тотожний всій товщі розчину. Статична поверхневе натяг (δ стат.) Характеризує поверхню розділу при настанні адсорбційної рівноваги.

У абсолютно чистих рідин (вода, бензол, абсолютний спирт і т.п.) поверхневий шар і вся товща рідкої фази цілком рівноцінні за своїм складом. Поверхневе натягнення подібного роду рідин з плином часу не змінюється. Інакше кажучи, у таких рідин значення δ стат. і δ дин. збігаються.

У розчину поверхнево-активних речовин поверхневий шар має властивості, близькі до властивостей всієї товщі рідкої фази тільки в момент формування поверхні розділу. Негайно ж після утворення поверхні починається адсорбція поверхнево-активних речовин, що закінчується через деякий проміжок часу адсорбційним рівновагою. Оскільки поверхнево-активні речовини знижують поверхневе натягнення, остільки в розчинах таких речовин δ стат. завжди нижче, ніж δ дин.

У деяких біологічних рідинах існують особливі взаємини між динамічним і статичним поверхневим натягом. Наприклад, плазма крові має властивість відновлювати вихідну величину поверхневого натягу, зменшену в результаті додавання поверхнево-активних речовин. Така здатність розчинів відновлювати вихідну величину поверхневого натягу називається поверхневої буферністю. Поверхнева буферність плазми про'являється наявністю в ній іонів кальцію, які реагують з поверхнево-активними жирними кислотами і утворюють з ними нерозчинні солі, не здатні вже змінювати величину поверхневого натягу. Велику роль в підтримці сталості поверхневого натягу плазми грають містяться в ній білки, які адсорбують поверхнево-активні речовини.

Таким чином, завдяки наявності білків і іонів кальцію плазма зберігає відносну сталість величини поверхневого натягу, різко змінюються тільки в випадках важких захворювань (наприклад, при жовтяниці, внаслідок попадання великої кількості жовчних кислот в кров). У зв'язку з цим вимір поверхневого натягу плазми крові, сечі і спинномозкової рідини має істотне значення для діагностики ряду захворювань.

Методи вимірювання.

Існує ряд методів визначення поверхневого натягу рідин: крапельний або сталагмометричний метод, метод наибільшого тиску бульбашки (метод Ребиндера) та ін.

У біології для визначення поверхневого натягу використовують метод П.А. Ребиндера і метод Дюну, заснований на вимірюванні сили, необхідної для відриву твердого контуру (кільця) від поверхневого шару рідини. Останній метод відрізняється простотою і швидкістю проведення вимірювань, НЕ вимагає великих кількостей рідини і особливо зручний для вивчення динаміки поверхневого натягу в розчинах, що містять поверхнево- активні речовини.

Визначення поверхневого натягу води.

Для визначення поверхневого натягу води платинове кільце, попередньо очищене прожарюванням в фарфоровому тиглі, беруть за дужку пінцетом і підвішують на гачок торсіонних ваг. Кільце ретельно зважують, після чого ваги аретира (балансують) без повернення покажчика до нуля. Досліджувану рідину (в даному випадку воду) в кількості 0,5-1 $см^3$ наливають на ретельно вимите і сухе годинне скло, яке поміщають на підйомний столик.

За допомогою кремальєри підйомного столика годинне скло піднімають до тих пір, поки поверхня рідини не стикнеться з кільцем ("топити" кільце в рідині не слід).

Після цього звільняють коромисло ваг і повільно повертають важіль натягу, поки кільце НЕ відірветься від рідини. Під час цієї маніпуляції треба все час стежити за кільцем і припинити рух важеля натягу точно в момент відриву кільця.

Записавши отримані дані, швидко опускають підйомний столик і зважують кільце разом з прилиплою до нього рідиною. Істинну силу відриву кільця визначають по формулі

$$P = P_1 - p \ , \qquad (3)$$

е P_1 сила відриву, певна в досвіді, мг;

р - вага кільця з прилиплою до нього рідиною, мг.

Поверхневий натяг води визначається за формулою

$$\delta_{H2O} = \frac{P}{2\pi r} \ , \qquad (4)$$

де Р - справжня сила відриву, дин;

r - зовнішній радіус кільця, см.

Для того, щоб висловити Р в динах, з ледует дані, отримані в досвіді і розраховані по формулі (3), розділити на 1000 для перекладу міліграмів в грами і помножити на 981 (1Г = 981 дин). Тому в роботі зручно користуватися формулою (4) в дещо зміненому вигляді:

$$\delta_{H2O} = \frac{P\ 981}{\pi\ Д1000} = \frac{P\ 0{,}981}{\pi\ Д} \text{ дин/см} \qquad (5)$$

Радіус платинового кільця замінюють його діаметром (Д), щоб уникнути зайвих арифметичних операцій, так як безпосередньо в досвіді доводиться вимірювати саме діаметр кільця (в см).

З огляду на залежність поверхневого натягу від температури, значення останньої слід обов'язково записувати при проведенні вимірювань.

Визначення поверхневого натягу різних рідин.

Дослід для визначення поверхневого натягу інших рідин, крім води, виконують за тією ж процедурою, але розрахунки мають значні відмінності.

Рівняння (4) справедливо тільки для води. Залежність між силою відриву і величиною поверхневого натягу для інших рідин, в особливості для погано змочують кільце, виявляється більш складною.

Для того, щоб визначити поверхневе натяг досліджуваної рідини, спочатку обчислюють відношення сили відриву кільця від даної рідини до сили відриву кільця від води при даній температурі

$$Q\text{знайден.} = \frac{P_x}{P_{H2O}} \qquad (6)$$

где P_x - сила відриву від даної рідини, мг;

P_{H2O} - сила відриву від води, мг

$Q_{знайден.}$ пов'язане з відносним поверхневий натяг даної рідини (відносним поверхневим натягом називається відношення поверхневого натягу данной рідини до поверхневого натягу води) залежністю, яка виражається рівнянням:

$$Q_{істин.} = (Q_{знайден.} \times К) - К + 1\ , \qquad (7)$$

де К - емпірична константа, експериментально визначається для кожного кільця (спосіб визначення см. нижче).

Як вже було показано, Q істин. одно відношенню абсолютного поверхневого натягу даної рідини до абсолютного поверхневому натягу води, тобто

$$Q_{істин.} = \frac{\delta_x}{\delta_{H2O}}, \qquad (8)$$

де δ_{H20} - коефіцієнт поверхневого натягу води, дин/см;

δ_x - коефіцієнт поверхневого натягу досліджуваної рідини.

З рівняння випливає:

$$\delta_x = \delta_{H2O} \times Q_{істин.}$$

Дослідження поверхневої буферності плазми крові.

На предметне скло розміщують 0,5 $см^3$ плазми крові і визначають її поверхневий натяг. Визначення проводять два рази з інтервалом 3-5 хв. Після цього до плазми додають дві краплі 0,1% розчину олеата натрію, попередньо розведеного в 10 разів фізіологічним розчином. Визначають силу відриву кільця відразу ж сел ле додавання поверхнево активної речовини, а потім через 1, 3, 5, 10 і 15 хв. Точно такий же досвід проводять з фізіологічним розчином (як контрольного).

На підставі отриманих даних обчислюють зміну величини поверхневого натягу в часі, відкладаючи на осі абсцис час в хвилинах, а на осі ординат значення поверхневого натягу.

Визначення константи кільця.

Для визначення константи кільця зручно користуватися простим експериментальним методом. Згідно цього методу визначають силу відриву кільця від води і від будь-якої іншої рідини, абсолютне поверхневий натяг якої можна знайти в таблицях. Найчастіше для цієї мети застосовують 96 ° етиловий спирт або хлороформ.

Обчислення константи кільця К проводиться за формулою:

$$К = \frac{Q_{истин.} - 1}{Q_{найден.} - 1} \qquad (9)$$

Підставляючи в рівняння (9) значення $Q_{істин.}$ та $Q_{знайден.}$, одержимо:

$$K = \frac{\delta_x/\delta_{H2O} - 1}{P_x/P_{H2O} - 1} \quad (10)$$

Значение δ_x (коефіцієнт абсолютного поверхневого натягу спирту або інший взятої для визначення рідини при температурі досвіду) знаходять в таблиці (δ_x хлороформу - 26 дин / см при 20 ° С).

Лабораторна робота № 3
ПРОНИКНІСТЬ КЛІТИН І ТКАНИН

Проникність - це здатність клітин і тканин пропускати і поглинати розчини і гази з навколишнього середовища і виділяти їх назовні. Дослідити проникність - означає вивчити процеси, що відбуваються на межі поділу між живим організмом і неживої навколишнім середовищем. Знання механізмів проникності важливо для понима ня сутності обміну речовин, розподілу речовин між різними утвореннями всередині організму, виникнення біологічних потенціалів та інших процесів, як в нормі, так і при патологічних змінах. Оцінка проникності має важливе значення і тісно пов'язане з вирішенням ряду практичних завдань фізіології і медицини.

Існують такі теорії вибіркової проникності клітин і тканин, по-різному трактують субстрат і умови цього процесу. Згідно мембранної теорії клітинної проникності розподіл речовин між клітиною і середовищем пояснюється наявністю субмікроскопічної мембрани, вибірково проникною для молекул і іонів. Протоплазма клітин вважається колоїдів, в якому майже вся вода знаходиться в вільному стані і має властивостями розчинника. В основі сорбційної теорії проникності лежить уявлення про протоплазмі як про що не змішується з водою фазі, в якій вода і іони знаходяться в зв'язаному стані. Надходження речовин в клітку регулюється всієї протоплазми і визначається факторами сорбції (розчинність, хімічним зв'язуванням, адсорбцією і ін.). За сучасним уявленням клітинні мембрани складаються з двох паралельних шарів молекул фосфоліпідів (≈50%), і білків (≈40%). У менших кількостях в склад мембрани входять інші ліпіди, холестерол і вуглеводи. Низькомолекулярні речовини, вода, гази можуть проникати в клітку під дією осмотичних сил, шляхом дифузії і ультрафільтрації, без енергетичних витрат (пасивний перенос). Для іонів проникність залежить від електричного заряду, градієнта потенціалу між зовнішньою і внутрішньою поверхнею мембран. Активним перенесенням позначаються процеси, що відбуваються з витратою енергії, що виробляється в клітці в процесі метаболізму (фосфорилювання, дефосфорилювання, утворення складних комплексів речовин, наявність молекул-переносників, участь ферментів і т.д.). При цьому речовини можуть рухатися проти градієнта концентрацій. Одним з способів проникнення речовин в клітку є піноцитоз. Процес цей полягає в адсорбції речовин клітинної оболонкою, зменшенні її поверхневого натягу і вгинання всередину цитоплазми з утворенням піноцитарних вакуолей; згодом їх оболонка руйнується, і речовини включаються в клітинний метаболізм.

Дослідити проникність - означає вивчити процеси, що відбуваються на

кордоні розділу між живим організмом і неживої навколишнього середовищем. Знання механізмів проникності важливо для розуміння сутності обміну речовин, розподілу речовин між різними утвореннями всередині організму, виникнення біологічних потенціалів і інших процесів. Порушення проникності є істотним ланкою в патогенезі багатьох патологічних процесів (алергія, запалення, набряк, шок), в механізмі змін всмоктування, секреції, екскреції, обміну речовин.

В основі проникності лежить явище дифузії, яке описується законом Фіка:

$$dm/dt = - DS \times dc/dx ,$$

де m – маса речовини, г; t – час, сек; D – коефіцієнт дифузії, $см^2 \cdot сек^{-1}$; S – площа поверхні, перпендикулярної напряму дифузії, $см^3$; с – концентрація речовини, $г \cdot см^{-3}$; х – відстань від вихідної точки дифузії, см.

Як видно з наведеної формули, швидкість дифузії dm / dt прямо пропорційна площі поверхні, через яку відбувається дифузія, концентраційного градієнту і обернено пропорційна відстані.

Дослідження проникності має важливе общебиологическое значення і тісно пов'язане з вирішенням ряду практичних завдань фізіології і медицини. Найбільш зручні для дослідження проникності пластинчасті органи і тканини. До ожа жаби, що володіє односторонньою проникністю, є класичною моделлю біологічно й мембрани. Вона складається з двох шарів: сполучно-тканинної і епітеліального. Епітеліальний шар шкіри жаби володіє хорошими адсорбційними властивостями і має кислу реакцію. Такий початковий шар характеризується слаболужним значенням середовища і низькими адсорбційними властивостями. Мабуть, ці особливості визначають здатність шкіри жаби вибірково пропускати речовини в тому або в іншому напрямку.

Так, наприклад, метіонін, метиленовий синій та інші барвники краще проникають в напрямку від сполучної тканини до епітелію. Основні барвники (нейтральний червоний) рухаються в зворотному напрямку. При всякого роду впливах стан шкіри жаби мен яется, що надає вплив на її односторонню проникність. Залежно від pH розчину барвника і розчину омиває шкіру з іншого боку, односторонньо рух того чи іншого речовини може бути ослаблене або посилено, а також змінено на проти оположное.

Дослідження проникності шкіри жаби для метиленового синього.

Хід роботи: Приготувати 0,65% - ний розчин хлористого натрію. На 0,65% -ному розчині хлористого натрію приготувати 0,05% - ний розчин метиленового синього. Знерухомити жабу. За допомогою ножиць вирізати

клапті шкіри з спини або черевця. Шматки шкіри зміцнити на розширених кінцях скляних циліндрів за допомогою ниток або гумок. Закріпити на двох циліндрах клапті шкіри в нутро епітелієм і на двох циліндрах - епітелієм назовні.

На скляні циліндри надіти гумові трубочки. Бюкси заповнити 0,65% - ним розчином хлористого натрію (10 мл). У скляні циліндри з клаптями шкіри влити 0,65% - ний розчин хлористого натрію і переконатися в їх герметичності. Потім вилити розчин хлористого натрію і налити по 2 мл розчину барвника. Підготовлені скляні циліндри з клаптями шкіри і розчином барвника занурити в бюкси з розчином 0,65% - ного хлористого натрію. Простежити, щоб збіглися рівні розчину хлористого натрію в бюксе і розчину барвника в скляному циліндрі. Шкірні клапті в бюксах інкубувати 3 години при температурі 22^0С. З цією метою їх треба помістити в попередньо підготовлений термостат. Після завершення часу інкубації профотометрувати розчини, що знаходяться в бюксах. Будуть отримані значення коефіцієнта поглинання отриманого розчину метиленового синього в бюксе.

Концентрацію барвника в цих розчинах необхідно визначити з допомогою градуювальних кривих, отриманих на фотоелектроколориметрі. Для цього провести вимірювання коефіцієнта поглинання розчину метиленового синього різних концентрацій і побудувати градуювальну криву. Подробиці вимірювання коефіцієнта поглинання наведені в описі до фотоелектроколориметра.

Досліди повторити з клаптями шкіри, попередньо витриманими їх протягом 30 хвилин в наступних розчинах:

1) в дистильованої воді;

2) в 70% -ному розчині етилового спирту;

3) в 0,93% (0,125 М) розчині хлористого калію.

Результати роботи оформити в вигляді таблиці 1.

Таблиця 1. Запис результатів

Об’єкт	Кількість барвника, що пройшов бар’єр			
	NaCl	H_2O	70% спирт	KCl
Епітелій назовні				
Епітелій всередину				

Лабораторна робота № 4.
ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЇ РОЗЧИНІВ ЗА ДОПОМОГОЮ РЕФРАКТОМЕТРА

Рефрактометр – це оптичний прилад, призначений для вимірювання концентрації розчинів різних речовин на основі визначення показника заломлення світла у цих розчинах.

Сучасні рефрактометри поділяються на промислові, лабораторні та портативні.

Промислові та лабораторні рефрактометри призначені для дослідження речовин з високою точністю під час наукових дослідженнях, при контролі технологічних процесів на виробництві, у службах метрології, стандартизації та сертифікації. Такі прилади обов'язково мають систему контролю температури вимірювального середовища.

Портативні (кишенькові) рефрактометри призначені для оперативного контролю складу речовин у лабораторії, на виробництві або в польових умовах. Вони поділяються на цифрові та ручні. Цифрові портативні рефрактометри мають екран, на якому відображаються результати вимірювань. Зазвичай вони реалізовують низку додаткових функцій, наприклад, одночасне вимірювання густини і коефіцієнта заломлення розчину, переведення результатів у різні одиниці вимірювання, підтримку температури зразка тощо.

Принцип дії рефрактометра оснований на використанні явища заломлення світла. При переході з одного середовища у інше промінь світла відхиляється від прямолінійного напряму на певний кут. Співвідношення кута входження променя світла у речовину і кута заломлення його на межі розділу двох середовищ називається коефіцієнтом (показником) заломлення. поворотом призми домагаються появи темного поля в окулярі, що відповідає положенню призми, при якому промінь світла відчуває повне внутрішнє відбиття від поверхні розділу між призмою і досліджуваним речовиною.

В лабораторній роботі використовується лабораторний рефрактометр RL-2 польського виробництва. Будова рефрактометра схематично зображена на рисунку 1.

Рефрактометр лабораторний RL-2 призначений для вимірів показників заломлення і середньої дисперсії рідини і твердих тіл, а також для визначення масової частки (у відсотках) у водних розчинах. Під час вимірювання поворотом гвинта, що з'єднаний з призмою, домагаються появи темного поля в окулярі, що відповідає положенню призми, при якому промінь світла відчуває повне внутрішнє відбиття від поверхні розділу між призмою і досліджуваним речовиною.

Зважаючи на високу точність досліджень, яка досягається при використання лише кількох крапель досліджуваної речовини, рефрактометричні вимірювання є зручним і ощадливим методом досліджень. Застосовуються вони повсюдно у випадах, коли складові суміші або розчину володіють різними показниками заломлення світла. Такі вимірювання широко застосовуються при дослідних і контрольних роботах, зокрема в споживній, хімічній галузі та медицині.

Відносний показник заломлення n – це відношення швидкостей світла у двох середовищах. Для рідин і твердих тіл n визначають відносно повітря, для газів – відносно вакууму. Значення n залежить від довжини хвилі світла і температури.

Наприклад, при 20 °С для D-лінії спектру натрію (λ=589 нм) – n_D^{20}, або просто n_D . У випадку газів необхідно враховувати залижність *n* від тиску. В ідеальній системі залежність *n* від її складових близька до лінійної.

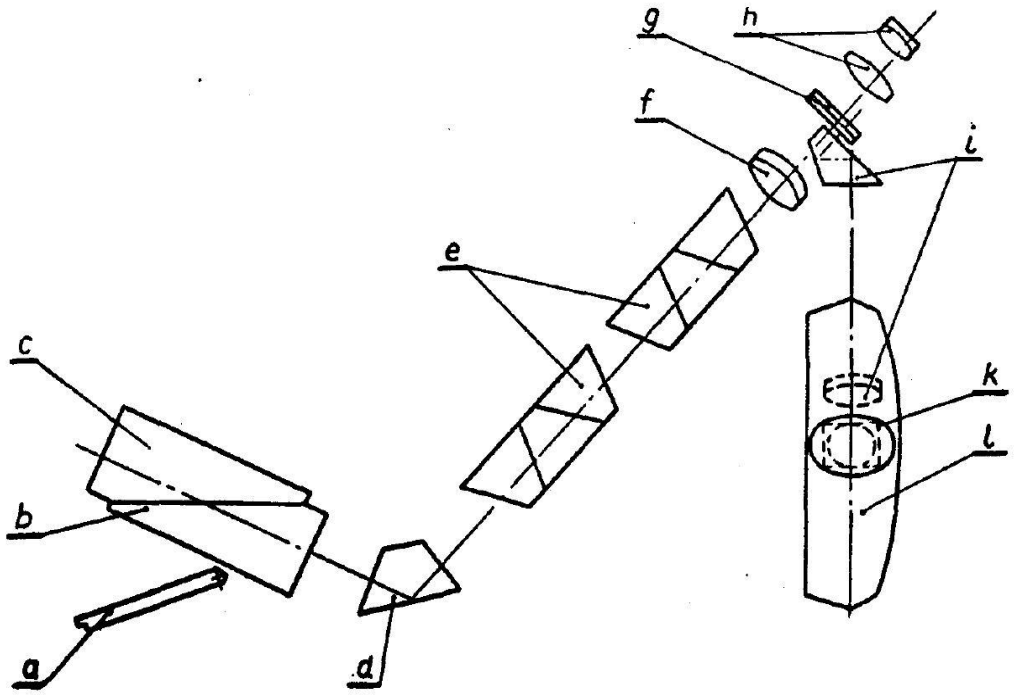


Рис. 1. Оптична система рефрактометра RL-2
a – дзеркало, *b* – основна призма (рефрактометрична). *c* – освітлювальна призма, *d* – керувальна призма, *e* – призми Амічі, *f* – об'єктив, *g* – діафрагма, *h* – окуляр, *i* – система зчитування, *k* – освітлювальна система, *l* – проградуйована пластина (шкала)

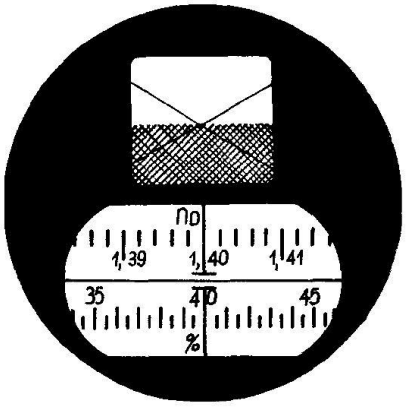


Рис. 2. Поле виду в окулярі рефрактометра при дослідженні розчину, що містить 40 % цукру

Правий гвинт рефрактометра забезпечує ахроматизацію (різкість та усунення кольорового забарвлення) верхнього вікна в окулярі. Ним же визначається параметр Z. Значення Z приймається як середнє арифметичне після мінімум п’яти вимірювань зразків однієї досліджуваної речовини. Для визначеного значення Z з таблиці 2 знаходимо значення δ з відповідним знаком. Після цього визначають показник заломлення n_D, приймаючи його значення як середнє арифметичне після мінімум п’яти вимірювань. За показником заломлення n_D з таблиці 3 визначають значення

параметрів A і B. Для спрощення інтерполяції в таблиці наведено колонки різниць. Середню дисперсію ($N_F - N_C$) визначають з виразу

$$N_F - N_C = A + B\delta.$$

Показник дисперсії (число Аббе) визначають за формулою

$$V = \frac{n_D - 1}{N_F - N_C}.$$

.

V – це безрозмірна величина, що використовується в оптиці як міра дисперсії світла в прозорих середовищах. Чим вона менша, тим більшою є дисперсія і тим сильніша хроматична аберація середовища.

Концентрація довільної розчиненої речовини у розчиннику у грамах на мілілітр (г/мл) визначається за формулою:

$$\mathrm{C} = \frac{n - n_0}{F \cdot 100},$$

.

де n – показник заломлення розчину;

n_0 – показник заломлення розчинника;

F – рефрактометричний фактор, який визначає величину приросту показника заломлення розчину при збільшенні концентрації розчиненої речовини на 1 %. Для глюкози F складає 0,00142.

Якщо у розчині міститься більше однієї розчиненої речовини, то за показником заломлення не можна визначити вміст кожної з них. Але у випадку, коли один із складників розчину за вмістом значно переважає інші, рештою складників можна знехтувати.

Завдання: розрахувати показник заломлення V для проведених вимірювань та побудувати **графік залежності V від концентрації цукру у воді**. У графік включити точку для дистильованої води.

Для дистильованої води Z=25,0; n_D=1,333.

Таблиця 2

Z	δ	Δδ w jed. 10^{-3} dla Δ = 0,1	Z
0	**1,000**	0,1	**60**
1	0,999	0,4	59
2	0,995	0,7	58
3	0,988	1,0	57
4	0,978	1,2	56
5	0,966	1,5	55
6	0,951	1,7	54
7	0,934	2,0	53
8	0,914	2,3	52
9	**0,891**	2,5	**51**
10	**0,866**	2,7	**50**
11	0,839	3,0	49
12	0,809	3,2	48
13	0,777	3,4	47
14	0,743	3,6	46
15	0,707	3,8	45
16	0,669	4,0	44
17	0,629	4,1	43
18	0,588	4,3	42
19	**0,545**	4,5	**41**
20	**0,500**	4,6	**40**
21	0,454	4,7	39
22	0,407	4,9	38
23	0,358	4,9	37
24	0,309	5,0	36
25	0,259	5,1	35
26	0,208	5,2	34
27	0,156	5,2	33
28	0,104	5,2	32
29	**0,052**	5,2	**31**
30	**0,000**		**30**

Для значень Z, менших 30, δ береться зі знаком +, більше 30 – зі знаком –

Таблиця 3

N_D	A	A w jed. 10^{-5} dla N=0,001	B	B w jed. 10^{-5} dla N=0,001	N_D
1,300	0,02487	- 0,5	0,03271	- 1,4	1,300
1,310	0,02482	- 0,5	0,03257	- 1,5	1,310
1,320	0,02477	- 0,4	0,03242	- 1,7	1,320
1,330	0,02473	- 0,5	0,03225	- 1,8	1,330
1,340	0,02468	- 0,5	0,03207	- 2,0	1,340
1,350	0,02463	- 0,4	0,03187	- 2,2	1,350
1,360	0,02459	- 0,4	0,03165	- 2,3	1,360
1,370	0,02455	- 0,4	0,03142	- 2,4	1,370
1,380	0,02451	- 0,4	0,03118	- 2,6	1,380
1,390	**0,02447**	- 0,4	**0,03092**	- 2,8	**1,390**
1,400	0,02443	- 0,3	0,03064	- 2,9	1,400
1,410	0,02440	- 0,3	0,03035	- 3,1	1,410
1,420	0,02437	- 0,3	0,03004	- 3,2	1,420
1,430	0,02434	- 0,3	0,02972	- 3,4	1,430
1,440	0,02431	- 0,3	0,02938	- 3,6	1,440
1,450	0,02428	- 0,3	0,02902	- 3,7	1,450
1,460	0,02425	- 0,2	0,02865	- 3,9	1,460
1,470	0,02423	- 0,2	0,02826	- 4,1	1,470
1,480	0,02421	- 0,2	0,02765	- 4,2	1,480
1,490	**0,02419**	- 0,1	**0,02743**	- 4,5	**1,490**
1,500	0,02418	- 0,1	0,02698	- 4,6	1,500
1,510	0,02417	- 0,1	0,02652	- 4,9	1,510
1,520	0,02416	- 0,1	0,02603	- 5,1	1,520
1,530	0,02415	- 0,0	0,02552	- 5,3	1,530
1,540	0,02415	- 0,0	0,02499	- 5,5	1,540
1,550	0,02415	- 0,0	0,02444	- 5,7	1,550
1,560	0,02415	+ 0,1	0,02387	- 6,0	1,560
1,570	0,02416	+ 0,1	0,02327	- 6,3	1,570
1,580	0,02417	+ 0,2	0,02264	- 6,5	1,580
1,590	**0,02419**	+ 0,2	**0,02199**	- 6,9	**1,590**
1,600	0,02421	+ 0,3	0,02130	- 7,1	1,600
1,610	0,02424	+ 0,3	0,02059	- 7,5	1,610
1,620	0,02427	+ 0,4	0,01984	- 7,9	1,620
1,630	0,02431	+ 0,4	0,01905	- 8,3	1,630
1,640	0,02435	+ 0,6	0,01822	- 8,7	1,640
1,650	0,02441	+ 0,7	0,01735	- 9,2	1,650
1,660	0,02448	+ 0,7	0,01643	-9,8	1,660
1,670	0,02455	+ 0,9	0,01545	- 10,4	1,670
1,680	0,02464	+ 1,1	0,01441	- 11,2	1,680
1,690	**0,02475**	+ 1,3	**0,01329**	- 12,1	**1,690**
1,700	0,02488		0,01208		1,700

Застосування рефрактометрів.

У харчовій промисловості:

- контроль якості алкогольних напоїв;
- визначення масової частки розчинених сухих речовин в продуктах переробки, а також свіжих плодах та овочах;
- визначення концентрації цукру в напоях, сиропах, консервах;
- вимірювання вмісту жиру в твердих продуктах харчування;
- вимірювання масової частки білків та сухих обезжирених речовин в молоці;
- визначення вологості меду.

В медицині та фармації:

- визначення кількості білка в сироватці крові;
- визначення густини сечі, субретинальної рідини ока та інших рідин;
- в офтальмології – визначення сили заломлення ока людини, що використовується лікарями для діагностики таких захворювань як короткозорість, далекозорість та астигматизм (в даний час використовуються автоматичні (комп'ютерні) авторефрактометри);
- визначення концентрації ліків;
- дослідження концентрацій розчинів.

В технологічних процесах на виробництві:

- вимірювання концентрацій в процесі росту кристалів;
- керування технологічним процесом із застосування спеціальних травильних розчинів;
- для контролю ступеня полімеризації при виробництві пластмас і синтетичних смол;
- при виробництві мінеральних добрив.

При обслуговуванні автомобілів, тракторів, суден – для визначення сорту моторних палив, олив, охолоджувальних рідин.

Оформлення звіту з лабораторної роботи:

1. Титульний аркуш.
2. Теоретичні відомості по рефрактометрії, які включають опис принципу роботи приладу.
3. Таблиця з результатами дослідів.
4. Графік залежності *V* від концентрації цукру (можна малювати вручну).
5. Висновки.

Лабораторна робота № 5.
ВИМІРЮВАННЯ БІОЕЛЕКТРИЧНИХ ПОТЕНЦІАЛІВ

Багато процесів, що протікають як в тварин, так і в рослинних організмах супроводжуються виникненням електрорухомий сил в клітинах і тканинах і появою біоелектричних потенціалів.

Розрізняють три основні групи біоелектричних потенціалів: метаболічні потенціали; мембранні потенціали і потенціали ушкодження (демаркаційні потенціали); потенціали дії.

Кожній з цих груп потенціалів властива певна зв'язок з конкретними біологічними процесами.

До групи метаболічних потенціалів відносяться стаціонарні, постійні у часі різниці потенціалів, які встановлюються між ділянками тканин, що характеризуються різними рівнями (інтенсивністю) обміну речовин. Прикладами метаболічних потенціалів можуть служити різниці потенціалів між зовнішньою і внутрішньою поверхнею шкіри жаби, між стеблом і листком, кінчиками коренів і стовбуром і т.д.

До демаркаційним відносяться потенціали, що виникають між інтактним (тобто, цілим) і пошкодженим ділянками клітини або тканини (потенціали ушкодження), а також різниця потенціалів між зовнішньою і внутрішньою поверхнею мембрани клітини (мембранні потенціали). При цьому, пошкоджений ділянку і внутрішня середу клітини виявляються електронегативними по відношенню до непошкодженому ділянці або зовнішньої поверхні клітин. Мембранні потенціали притаманні всім живим клітинам. Мембранні потенціали, які є в збудливих клітинах, називають також потенціалами спокою. Величина мембранного потенціалу в різних клітинах коливається від -50 до -85 мВ.

При подразненні збудливих клітин заряд на їх мембрані змінюється на протилежний і виникає потенціал дії (ПД), амплітуда якого може досягати 110 - 150 мВ. Між порушеними і не збудженим ділянками органу або тканини виникає різниця потенціалів, причому збуджений ділянку виявляється електронегативним по відношенню до непорушення і, в результаті, ПД отримує здатність поширюватися на значні відстані без будь-яких змін амплітуди.

За фізико-хімічними основам виникнення біоелектричні потенціали поділяються на потенціали іонної природи (власне біоелектричні потенціали) і окисно-відновні потенціали. Перші обумовлені нерівномірним розподілом іонів між цитоплазмою і позаклітинної середовищем, тобто асиметрією

розподілу іонів (в основному, іонів K^+, Na^+, Cl^-). Другі - нерівномірним розподілом електронів між ділянками тканин, що відрізняються один від одного, в основному, інтенсивністю дихальних і гликолитических процесів, при яких відбувається приєднання і віддача електронів молекулами біосубстратах .

Біоелектричні потенціали можуть служити чутливими показниками, що характеризують нормальні фізіологічні процеси в організмі, а також патологічні явища.

Реєстрація біопотенціалів.

Величина біопотенціалів, в залежності від об'єкта і способу відведення, може становити сотні мікровольт або одиниці і десятки мілівольт, але зазвичай не перевищує 100-150 мВ. Для посилення і вимірювання постійних потенціалів використовуються мілівольтметри постійного струму (при вимірюванні значних по величині потенціалів можуть бути ис користані лабораторні рН-лічильник). Для посилення і реєстрації потенціалів дії використовують спеціальні підсилювачі біопотенціалів (ПБП) і осцилографи.

Існує два способи відведення біопотенціалів: а) позаклітинний з допомогою зовнішніх електродів, б) внутрішньоклітинний з допомогою мікроелектродів.

Метод внутрішньоклітинних відведень, з допомогою спеціальних мікроелектродів , дозволяє реєструвати різницю потенціалів, що існують між внутрішнім вмістом клітини і навколишнього середовищем. Мікроелектрод є тонкою скляну піпетку з діаметром кінчика до 0.5 мкм, заповнену 2,5 М розчином KCl. Розчин електроліту є провідним електричний струм "стрижнем", сама ж піпетка служить ізолятором цього провідника. "Стрижень" - це електролітичний місток між цитоплазмою і системою відведення.

Опір таких електродів, внаслідок незначності діаметра кінчика, може досягати 10-30 МОм (чим менше діаметр кінчика мікроелектрода , тим вище опір електрода, але тим менше пошкодження клітини). Мікроелектрод , який пов'язаний з підсилювачем через хлоровану срібну зволікання, вводиться в клітину з допомогою спеціального мікроманіпулятора.

Другий електрод (електрод порівняння) поміщається в зовнішній розчин, який є хорошим провідником. Різниця потенціалів, існуюча між зовнішнім розчином і внутрішнім вмістом клітини, називається мембранним потенціалом. Він реєструється в момент проколу мікроелектродами мембрани клітини. Слід врахувати, що при мікроелектродну дослідженнях вимірюється потенціал внутрішньої частини клітини, а потенціал зовнішньої середовища

приймається за нуль.

Якщо мікроелектрод не пошкодив клітку, то мембранний потенціал (потенціал спокою) може реєструватися тривалий час (рис. 1).

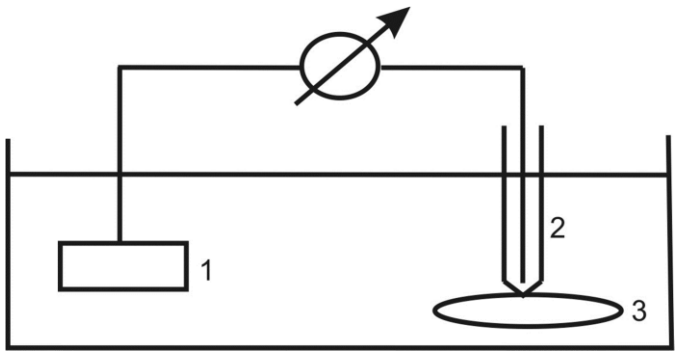


Рис. 1. Схема мікроелектродну відведення
1- електрод порівняння; 2- мікроелектрод; 3 - клітина

При позаклітинному відведенні проводиться вимір різниці потенціалів, яка виникає при пошкодженні або при порушенні між різними частинами клітини або між окремими групами клітин. При позаклітинному відведенні, яка вимірюється величина потенціалів завжди менше, ніж при мікроелектродну дослідженні. Так, потенціал спокою волокон кравецькій м'язи жаби при мікроелектродну відведенні становить -90 мВ, а при позаклітинному -30 мВ і менше. Величина потенціалу спокою при позаклітинному відведенні залежить від умов відведення, ступеня пошкодження і т.д.

За допомогою зовнішніх електродів фактично реєструється падіння напруги, створюване струмом, поточним між неушкодженим і пошкодженим ділянками тканини, на опорі провідного середовища R1 (рис. 2).

Потенціал, що реєструється, рівний:

$$V = V_{кл.} \frac{R_1}{R_1 + R_2} = V_{кл.} \frac{1}{1 + R_2/R_1}$$

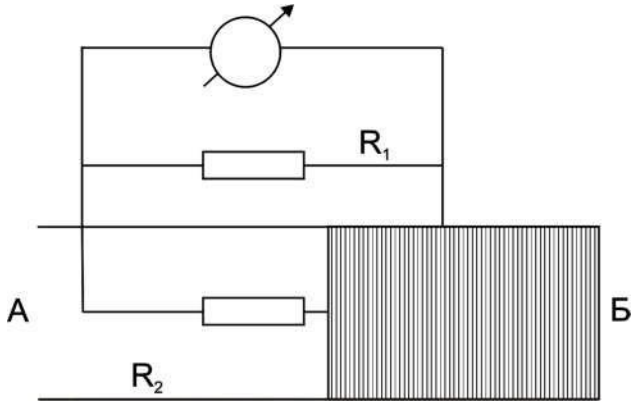


Рис. 2. Схема позаклітинного відведення потенціалів.
А - неушкоджена ділянка тканини:
Б - пошкоджена ділянка тканини:
R_1 - опір провідного середовища:
R_2 – опір мембрани клітини і її цитоплазми.

Таким чином, при позаклітинному відведенні реєструється та частка потенціалу клітини (Vкл) Яка визначається відношенням R2 (опір мембрани клітини і її цитоплазми) і R1 (опір зовнішнього розчину). З наведеної формули видно, що V тоді наближається до Vкл, Коли R2 / R1 прагне до нуля, тобто коли R1 більше R2.

Для збільшення опору зовнішнього розчину слід видалити його надлишок з міжелектродного ділянки тканини (з допомогою фільтрувальної папери) і покрити цю ділянку вазеліновим маслом (метод вазелінового містка). Іноді для збільшення зовнішнього опору застосовують розчин сахарози (метод сахарозний містка), за допомогою якого вдається зареєструвати до 95% величини досліджуваного потенціалу.

При реєстрації постійних біоелектричних потенціалів відводять електроди повинні бути неполярізующі мися, тобто не повинні змінювати свій потенціал при проходженні через них електричного струму. Для біологічних вимірювань зазвичай застосовують електроди, покриті шаром важко розчинної солі цього ж металу. До таких електродів відносяться срібні, покриті шаром хлористого срібла (хлоросрібні електроди), хлоровані платинові електроди. Широко використовуються також цинкові (Zn - $ZnS0_4$) та каломельні (Hg - Hg_2Cl_2) електроди.

Вимірювання потенціалу спокою нерва жаби. Залежність величини потенціалу спокою від концентрації іонів калію в середовищі.

Хід роботи: Приготувати препарат ізольованого сідничного нерву жаби. Після нетривалого (10-15 хв) витримування в нормальному розчину Рінгера, нерв помістити в камеру (рис. 3), попередньо обсушити його на

фільтрувальної папері. Ділянка нерва між відділеннями камери А і Б покрити сумішшю вазеліну і вазелінового масла (вазеліновий місток) для підвищення міжелектродного опору. Потім в відділення А і Б налити нормальний розчин Рінгера і опустити в них відводні електроди, закріплені в тримачах. До електродів підключити цифровий мілівольтметр.

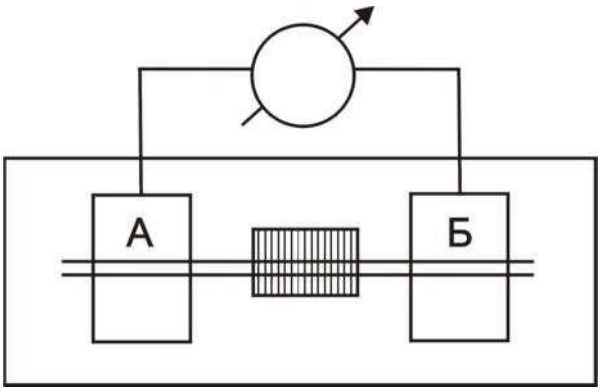


Рис. 3. Схема реєстрації потенціалу спокою нерва. Пояснення в тексті.

Завдання 1. Виміряти різницю потенціалів між двома інтактними ділянками нерва. Ця різниця зазвичай не перевищує 3-5 мВ і пов'язана з різницею потенціалів самих електродів, що не поляризуються (асиметрією електродів).

Потім нормальний розчин Рінгера в відділенні Б замінити на ізотонічний розчин хлористого калію або піддати цей ділянку механічному пошкодження (з допомогою пінцета).

Після стабілізації показань записати величину потенціалу спокою нерву.

Завдання 2. Визначити вплив підвищеної концентрації іонів каліюна величину потенціалу спокою нерву.

Для цього нормальний розчин Рінгера в відділенні А замініть на розчин, в якому концентрація K^+ збільшена в 4 рази. Записувати зміни величини потенціалу спокою щохвилини протягом 10-15 хв. Потім знову замінити розчин у відділенні А на нормальний розчин Рінгера і почекати відновлення потенціалу.

Повторити те ж саме з фізіологічним розчином KCI. Побудувати відповідні графіки зміни потенціалу спокою нерву.

Реєстрація потенціалу дії нерву жаби.

Установка для реєстрації потенціалу дії нерву складається з осцилографа 1, підсилювача біопотенціалів 2 і стимулятора 3 (рис. 4).

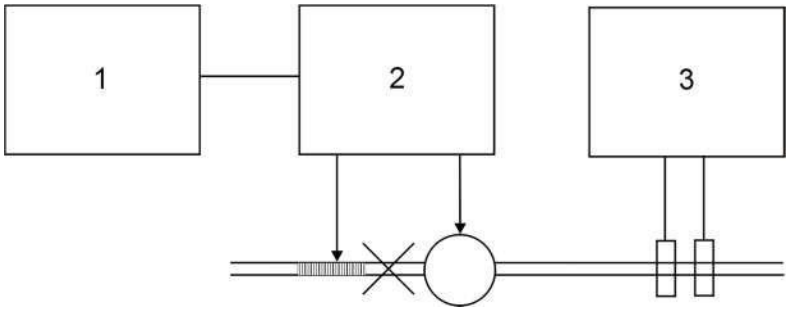


Рис. 4. Схема установки для реєстрації потенціалу дії нерва

Хід роботи: Відпрепарований сідничний нерв жаби обсушити на фільтрувальному папері і помістити в камеру з "повітряним містком" між відвідними електродами. Заповнити відділення камери нормальним розчином Рінгера і опустити в них чутливі та стимулюючі електроди.

Завдання 1. Зареєструвати потенціал дії між двома інтактними ділянками нерва (двофазний ПД).

Включити стимулятор (частота подразнення 10-30 імп/с) і збільшувати поступово амплітуду стимулу, для того, щоб визначити порогову силу подразнення (мінімальна сила, при якій на екрані осцилографа з'являється ПД). Потім визначити максимальну силу подразнення, при досягненні якої амплітуда ПД перестає збільшуватися, оскільки всі нервові волокна залучені до проведення ПД.

Замалювати форму кривої потенціалу дії і визначити його амплітуду в мілівольтах за допомогою калібрувального сигналу.

Завдання 2. Зареєструвати потенціал дії між інтактною і пошкодженою (альтерованою) ділянкою нерву (монофазні ПД).

Нанести механічне пошкодження (за допомогою пінцета) ділянці нерву, що знаходиться під дистальним чутливим електродом (на рис. 4 заштриховано). Включити стимулятор і замалювати реєстрований потенціал дії. Відзначити його відміну від двофазного потенціалу.

Завдання 3. Вплив на потенціал дії хлористого калію.

Замінити нормальний розчин Рінгера в відділенні камери під проксимальним електродом (на рис. 4 позначена колом) на ізотонічний розчин хлориду калію. Зареєструвати зміни амплітуди ПД у часі і показати ці зміни графічно. Перевірити оборотність дії надлишку іонів калію, знову змінивши розчин на нормальний.

Вимірювання потенціалу ушкодження (потенціалу спокою) м'язи жаби.

В роботі використовується вимірювальна установка, що складається з цифрового мілівольтметра і електродів, що не поляризуються.

Хід роботи: Відпрепарувати литковий м'яз жаби і помістити його у вологу камеру. До м'язу прикладають електроди (міжелектродна відстань 1,0 - 1,5 см) і вимірюють різницю потенціалів між двома неушкодженими ділянками поверхні м'язи. Виміряна різниця зазвичай не перевищує 3-5 мВ і обумовлена асиметрією електродів.

Потім під одним з електродів ножицями пошкодити м'яз і визначити різницю потенціалів між неушкодженою і пошкодженою поверхнею (потенціал спокою). Вимірювати різницю потенціалів протягом 30 хв (кожні 5 хв) та записати дані у вигляді таблиці. Потім на неушкоджений ділянку м'яза (під другим електродом) помістити ватку, змочену фізіологічним розчином хлористого калію. Вимірювання провідність до тих пір, поки різниця потенціалів не впаде до кількох мВ. За отриманими результатами побудувати графіки зміни потенціалу спокою в часі і впливу на нього розчину KCI.

Перелік літератури

1. Davidovits P. Physics in biology and medicine / Paul Davidovits. – 3rd ed. – Oxford : Elsevier – Academic Press, 2008. – 328 p.
2. Bialek, William. Biophysics: searching for principles. Princeton University Press, 2012. – 310 p.
3. Campbell, Gaylon S., and John M. Norman. An introduction to environmental biophysics. Springer Science & Business Media, 2012. – 308 p.
4. Concepts in Bioinformatics and Genomics / J. Momand, A. McCurdy, S. Heubach, N. Warter-Perez. – New York : Oxford University Press, 2017. – 504 p.
5. Медична та біологічна фізика : підручник / за ред. проф. О. В. Чалого. – Вінниця : Нова Книга, 2013. – 528 с.
6. Азнакаєв Е. Г. Біофізика : навчальний посібник / Е. Г. Азнакаєв. – К. : НАУ, 2005. – 308 с.
7. Біофізика і біомеханіка : підручник / В. С. Антонюк, М. О. Бондаренко, В. А. Ващенко та ін. – К. : Політехніка, 2012. – 344 с.
8. Григор'єва Л. І. Основи біофізики і біомеханіки / Л. І. Григор'єва, Ю. А. Томілін. – Миколаїв : ЧДУ ім. Петра Могили, 2011. – 298 с.
9. Sung W.-K. Algorithms in Bioinformatics: A Practical Introduction / Wing-Kin Sung. – Boca Raton : CRC Press, 2009. – 407 p.
10. Sargent, John A., and Frank A. Gotch. "Principles and biophysics of dialysis." Replacement of renal function by dialysis. Springer, Dordrecht, 1996. 34-102.
11. Биофизика для инженеров : учебное пособие. В 2 томах. Том 1. – Биоэнергетика, биомембранология и биологическая электродинамика / Е. В. Бигдай, С. П. Вихров, Н. В. Гривенная и др. ; под ред. С. П. Вихрова и В. О. Самойлова. – М. : Горячая линия–Телеком, 2008. – 496 с.
12. Інформаційні технології в біології та медицині : навчальний посібник / В. І. Гриценко, А. Б. Котова, М. І. Вовк [та ін.]. – К. : Наукова думка, 2007. – 383 с.

This project has been funded with support from the European Commission. This publication / communication reflects the views only of the author, and the Commission cannot be held responsibility for any use which may be made of the information contained therein