

**А.М. Еремеев, А.А. Еремеев, А.В. Яковлев,  
Х.Л. Гайнутдинов**

**МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ К  
ЛАБОРАТОРНЫМ РАБОТАМ ПО МЕДИЦИНСКОЙ  
БИОФИЗИКЕ**

*Учебно-методическое пособие*



КАЗАНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ  
2019

УДК 577  
ББК 28.071  
Е 70

*Печатается по рекомендации Учебно-методической комиссии  
Института фундаментальной медицины и биологии КФУ,  
протокол № 2 от 01 февраля 2019 г.*

**Рецензент:**

Заведующая кафедрой физиологии человека и животных КФУ  
**д.б.н., профессор Ситдикова Гузель Фаритовна**

**Еремеев А.М.**

**Е 70 Методические рекомендации к лабораторным работам по  
Медицинской биофизике / Еремеев А.М., Еремеев А.А., Яковлев А.В.,  
Гайнутдинов Х.Л. / – Казань: Казан. ун-т, 2019. – Учебно-методическое пособие.  
– 53 с.**

В настоящее учебно-методическое пособие включены практические и лабораторные работы, составленные в соответствии с общим курсом дисциплины «Медицинская биофизика» для студентов-медиков, обучающихся в институте фундаментальной медицины и биологии. Практикум знакомит студентов с некоторыми современными методами биофизических исследований. Работы рассчитаны на самостоятельное выполнение студентами. Описание работы по соответствующей теме включает теоретическую часть, методические указания и практические задачи. В конце практикума приведен справочный материал, содержащий основные биофизические константы и формулы.

Учебно-методическое пособие также может быть использовано при проведении практических занятий по биофизике у студентов университетов медицинских специализаций.

**УДК 577  
ББК 28.071**

**© Еремеев А.М., Еремеев А.А., Яковлев А.В., Гайнутдинов Х.Л., 2019.**

**© Казанский университет, 2019.**

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>Тема 1. Кинетика биологических процессов</b> .....	5
Работа 1. Вычисление температурного коэффициента и энергии активации процесса ассимиляции углекислоты веточкой элодеи....	6
Работа 2. Определение температурного коэффициента и вычисление энергии активации сокращения сердца лягушки.....	7
<b>Тема 2. Поверхностное натяжение</b> .....	8
Работа 1. Определение поверхностного натяжения воды.....	11
Работа 2. Определение поверхностного натяжения различных жидкостей..	12
Работа 3. Исследование поверхностной буферности плазмы крови....	13
Работа 4. Определение константы кольца.....	13
<b>Тема 3. Проницаемость клеток и тканей</b> .....	14
Работа 1. Исследование проницаемости кожи лягушки для метиленового синего.....	16
<b>Тема 4. Определение концентрации растворов при помощи рефрактометра</b> .....	18
Описание установки .....	19
Порядок выполнения работы .....	20
<b>Тема 5. Биоэлектрические потенциалы</b> .....	22
Регистрация биопотенциалов .....	23
Работа 1. Измерение потенциала покоя нерва лягушки. Зависимость величины потенциала покоя от концентрации ионов калия в среде.....	27
Работа 2. Регистрация потенциала действия нерва лягушки.....	28
Работа 3. Измерение потенциала повреждения (потенциала покоя) мышцы лягушки.....	29
<b>Тема 6. Моделирование электрических свойств возбудимой клетки.</b>	30
1. Потенциал покоя .....	30
2. Потенциал действия .....	32
Краткое описание работы модели .....	33
Компьютерная обработка модели .....	34
Опыт 1: Равновесный потенциал ... ..	34
Опыт 2: Влияние изменения концентраций ионов на ПП .....	35

Опыт 3: Метод фиксации потенциала для анализа токов $Na^+$ и $K^+$	36
Опыт 4: Влияние изменения концентрации ионов на ионные токи .....	36
Опыт 5: Зависимость Na - и K- токов от потенциала .....	37
<b>Тема 7. Билюминесценция</b> .....	40
Люминесцентный анализ .....	42
Работа 1. Знакомство с устройством и работой люминесцентного микроскопа МЛ-2.....	43
Работа 2. Изучение люминесценции хлорофилла.....	43
Работа 3. Изучение люминесценции нервных волокон окрашенных акретиновым оранжевым.....	43
<b>Основные биофизические формулы и константы</b> .....	44
<b>Список использованной литературы</b> .....	48
<b>Программа курса «Медицинская биофизика»</b> .....	49

## Тема 1. КИНЕТИКА БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

Биологическая кинетика изучает скорость биологических процессов и зависимость их от концентрации веществ, участвующих в биохимических превращениях, а также от внешних условий, в частности, от температуры. Такая зависимость понятна, если учесть, что любое химическое превращение происходит при условии соударения молекул, пребывающих в беспорядочном тепловом движении. По мере повышения температуры увеличивается скорость и длина пробега молекул и, следовательно, вероятность их столкновения друг с другом.

Таким образом, относительное количество молекул, способных вступить в реакции, т.е., активных молекул, с повышением температуры увеличивается, а сама скорость реакции возрастает.

Зависимость скорости процесса от температуры отражает формула:

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

где  $K$  – константа скорости;  $Z$  – число столкновений между молекулами;  $E$  – энергия активации;  $R$  – газовая постоянная;  $T$  – абсолютная температура.

Энергия активации отражает уровень кинетической энергии, которого должна достигнуть часть молекул для осуществления реакции, т.е. связана с количеством активных молекул, способных вступить в реакцию. Относительное количество активных молекул отражает величина  $e^{-E/RT}$  в вышеприведенной формуле. Если принять численное значение газовой константы за 2, то количество активных молекул при повышении температуры на  $10^\circ\text{C}$  увеличится в 2 раза.

Величину, показывающую во сколько раз увеличивается количество активных молекул (а следовательно, и скорость реакции) при повышении температуры на  $10^\circ\text{C}$ , называют температурным коэффициентом и обозначают символом  $Q_{10}$

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

где  $V_{T_1}$  - скорость реакции при начальной температуре

$V_{T_2}$  - скорость реакции при увеличении температуры на  $10^\circ$

Между величиной температурного коэффициента реакции  $Q_{10}$  и той избыточной энергией, которой должны обладать молекулы, чтобы их соударение привело к химической реакции (энергия активации -  $E$ ), существует зависимость, которая выражается формулой

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

где  $E$  - энергия активации в ккал/моль;

$T_1$  и  $T_2$  – температуры, выраженные в градусах абсолютной шкалы и отличающиеся друг от друга на  $10^\circ\text{C}$  ( $T_2 = T_1 + 10^\circ\text{C}$ );

$\lg Q_{10}$  - десятичный логарифм температурного коэффициента.

Данной формулой пользуются и для вычисления энергии активации биологических объектов, в том числе секреции желез, пульсации сократительных вакуолей простейших, сокращения мышц и т.д.

Для вычисления энергии активации какого-либо биологического процесса необходимо:

- 1) определить его скорость при двух температурах –  $T_1$  и  $T_2$ ;
- 2) вычислить величину  $Q_{10}$ , разделив величину скорости, полученную при  $T_2$  на величину, полученную при  $T_1$ .
- 3) найти в таблице логарифмов десятичный логарифм  $Q_{10}$ , подставить в формулу (3), найти полученное значение  $Q_{10}$  и произведение численных значений показаний температуры, выраженных в градусах абсолютной шкалы.

### *Лабораторные работы.*

#### ***Работа 1. Вычисление температурного коэффициента и энергии активации процесса ассимиляции углекислоты веточкой элодеи***

Увеличение скорости биологических процессов хорошо можно наблюдать по количеству выделяющихся пузырьков при изменении температуры воды в сосуде с веточкой элодеи.

*Ход работы:* Для опыта берут большую пробирку и наливают в нее воду комнатной температуры. Выбирают свежую веточку элодеи и острой бритвой обновляют срез стебля у ее основания. Это делается для того, чтобы освободить засорившиеся межклеточные ходы в стебле и дать свободный выход

образующимся газам. Веточку привязывают ниткой к стеклянной палочке так, чтобы срезанный кончик был направлен кверху. Пробирку с веточкой элодеи помещают в термостат и выставляют на свет. При этом из срезанного конца веточки начинают выделяться пузырьки газа. Считают количество пузырьков, выделяющихся в одну минуту. Такой подсчет делают несколько раз и определяют среднее арифметическое. Аналогично подсчитывают количество выделяющихся пузырьков при увеличении температуры на 10°C. После определения количества выделившихся пузырьков при двух разных температурах вычисляют  $Q_{10}$  и  $E$  по вышеуказанным формулам.

## ***Работа 2. Определение температурного коэффициента и вычисление энергии активации сокращения сердца лягушки***

*Цель работы:* определить изменение ритма сокращений сердца лягушки при различных значениях температуры и вычислить энергию его активации.

*Материалы:* препаровальная доска, набор препаровальных инструментов, лабораторный штатив, термометр, чашка Петри, нитки, секундомер, осуд с горячей водой или термостат, раствор Рингера для холоднокровных, лягушка.

Перед проведением эксперимента готовят препарат изолированного сердца лягушки. Лягушку вначале обездвигивают. Для этого ее декапотируют и разрушают спинной мозг при помощи зонда. Лягушку кладут на препаровальный столик вентральной строной вверх и фиксируют ее при помощи булавок, воткнутых в концы лапок. Маленькими ножницами делают продольный надрез кожи по средней линии в каудо-ростральном направлении и удаляют лоскуты кожи с груди и брюшка. Аналогичным образом вскрывают брюшную полость, перерезав мышцы брюшной стенки. Затем, чтобы не повредить сердце, делают косые надрезы в стороны в ростро-латеральных направлениях. Дойдя до пояса передних конечностей, перекусывают кости ножницами. Захватив большим пинцетом грудную кость и приподнимая ее вверх, осторожно подрезают маленькими ножницами подлежащие ткани, стараясь не повредить сердце. Грудную кость вместе с поясом передних конечностей удаляют. Захватив глазным пинцетом перикард, вырезают его глазными ножницами. Приподняв верхушку сердца, перерезают уздечку. При помощи глазного пинцета под дуги аорты подводят обрезки ниток и накладывают лигатуры. Концы ниток обрезают. Затем подводят еще одну нитку длиной 10-15 см и оставляют ее в расправленном состоянии.

Отпрепарированное сердце лягушки привязывают к стеклянной палочке и помещают в пробирку, заполненную раствором Рингера комнатной температуры. Подсчитывают количество сокращений сердца, затем повторяют измерения при увеличении температуры на 10°C и снижении на 10°C.

Подсчитывают среднее число сердечных сокращений в минуту при разных температурах и вычисляют значения  $Q_{10}$  и  $E$ .

## Тема 2. ПОВЕРХНОСТНОЕ НАТЯЖЕНИЕ

Определяющую роль в свойствах тонких жидких пленок и капиллярных явлениях играют **ван-дер-вальсовы взаимодействия**. Под **ван-дер-вальсовыми взаимодействиями** понимают взаимодействия, имеющие флуктуационное электромагнитное происхождение. Для этих взаимодействий во многих случаях характерна универсальная зависимость от расстояния. Так энергия диполь-дипольного ван-дер-вальсова взаимодействия двух атомов обратно пропорциональна шестой степени расстояния, а для атомов и поверхности конденсированной среды - третьей. Возрастание потенциала ван-дер-вальсовых взаимодействий вблизи поверхности конденсированной фазы, означает, что молекулы в поверхностном слое обладают дополнительной энергией по сравнению с молекулами внутри жидкости. Избыток свободной энергии  $\Delta F$ , приходящийся на единицу площади поверхности раздела фаз  $\Delta S$ , характеризуется **коэффициентом поверхностного натяжения  $\sigma$** :

$$\sigma = \Delta F / \Delta S \quad (1)$$

Часто величину  $\sigma$  называют просто **поверхностным натяжением**. Величину  $\sigma$  измеряют в Дж/м<sup>2</sup> или Н/м, либо дин/см.

На молекулу, находящуюся внутри жидкости, действуют силы притяжения со стороны окружающих ее молекул, в сумме компенсирующие друг друга. Молекула же на поверхности притягивается лишь молекулами, находящимися снизу и с боков от нее, и не испытывает заметного влияния со стороны молекул, находящихся сверху (пар). Некомпенсированность молекулярных сил в поверхностном слое является причиной возникновения силового поля на поверхности раздела двух фаз. Равнодействующая молекулярных сил на поверхности раздела не равна нулю и оказывается направленной внутрь жидкой фазы. Поверхность жидкости ведет себя как упругая мембрана. 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. Поэтому переход молекулы из глубины жидкости в поверхностный слой для увеличения поверхности связан с необходимостью совершения работы против действующих в поверхностном слое сил. Эта работа совершается молекулой за счет запаса ее кинетической энергии и идет на увеличение ее потенциальной энергии.

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

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

где S - площадь поверхности в см<sup>2</sup>;

$\delta$  - коэффициент поверхностного натяжения.

Таким образом, коэффициентом поверхностного натяжения называется работа, которую нужно произвести, чтобы увеличить площадь поверхности раздела на единицу площади поверхности. Соответственно коэффициент поверхностного натяжения выражают в эргхсм<sup>-2</sup>.

Так как эрг - это динахсм, то эргхсм<sup>-2</sup> = см см<sup>-2</sup> = динахсм<sup>-1</sup>, т.е., коэффициент поверхностного натяжения можно также выразить как силу, которую нужно приложить к периметру поверхности раздела для увеличения длины периметра на единицу длины.

Принято различать статическое и динамическое поверхностное натяжение.

Динамическое поверхностное натяжение ( $\delta$  дин.) характеризует только что образованную поверхность раздела, состав которой тождествен всей толще раствора. Статическое поверхностное натяжение ( $\delta$  стат.) характеризует поверхность раздела при наступлении адсорбционного равновесия.

У абсолютно чистых жидкостей (вода, бензол, абсолютный спирт и т.п.) поверхностный слой и вся толща жидкой фазы вполне равноценны по своему составу. Поверхностное натяжение подобного рода жидкостей с течением времени не изменяется. Иначе говоря, у таких жидкостей значение  $\delta$  стат. и  $\delta$  дин. совпадают.

У раствора поверхностно-активных веществ поверхностный слой имеет свойства, близкие к свойствам всей толще жидкой фазы только в момент формирования поверхности раздела. Тотчас же после образования поверхности начинается адсорбция поверхностно-активных веществ, заканчивающаяся

спустя некоторый промежуток времени адсорбционным равновесием. Поскольку **поверхностно-активные вещества понижают поверхностное натяжение**, постольку в растворах таких веществ  $\delta$  стат. всегда ниже, чем  $\delta$  дин.

В некоторых биологических жидкостях существуют особые взаимоотношения между динамическим и статическим поверхностным натяжением. Например, плазма крови обладает свойством восстанавливать исходную величину поверхностного натяжения, уменьшившуюся в результате добавления поверхностно-активных веществ. Такая способность растворов восстанавливать исходную величину поверхностного натяжения называется **поверхностной буферностью**. Поверхностная буферность плазмы объясняется наличием в ней ионов кальция, которые реагируют с поверхностно-активными жирными кислотами и образуют с ними нерастворимые соли, не способные уже изменять величину поверхностного натяжения. Большую роль в поддержании постоянства поверхностного натяжения плазмы играют содержащиеся в ней белки, которые адсорбируют поверхностно-активные вещества.

Таким образом, благодаря наличию белков и ионов кальция плазма сохраняет относительное постоянство величины поверхностного натяжения, резко изменяются только в случаях тяжелых заболеваний (например, при желтухе, вследствие попадания большого количества желчных кислот в кровь). В связи с этим измерение поверхностного натяжения плазмы крови, мочи и спинномозговой жидкости имеет существенное значение для диагностики ряда заболеваний.

#### *Методы измерения.*

Существует ряд методов определения поверхностного натяжения жидкостей: капельный или сталагмометрический метод, метод наибольшего давления пузырька (метод П.А. Ребиндера) и др.

В биологии для определения поверхностного натяжения используют метод П.А. Ребиндера и метод дюНуи, основанный на измерении силы, необходимой для отрыва твердого контура (кольца) от поверхностного слоя жидкости. Последний метод отличается простотой и быстротой проведения измерений, не требует больших количеств жидкости и особенно удобен для изучения динамики поверхностного натяжения в растворах, содержащих поверхностно-активные вещества.

## Лабораторные работы

### Работа 1. Определение поверхностного натяжения воды.

Для определения поверхностного натяжения воды платиновое кольцо, предварительно очищенное прокаливанием в фарфоровом тигле, берут за дужку пинцетом и подвешивают на крючок торсионных весов. Кольцо тщательно взвешивают, после чего весы арретируют (балансируют) без возвращения указателя к нулю. Исследуемую жидкость (в данном случае воду) в количестве 0,5-1 см<sup>3</sup> 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 вместе с прилипшей к нему жидкостью. Истинную силу отрыва кольца определяют по формуле

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

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

$p$  - вес кольца с прилипшей к нему жидкостью, мг.

Поверхностное натяжение воды определяется по формуле

$$\delta_{\text{H}_2\text{O}} = \frac{P}{2\pi r}, \quad (4)$$

где  $P$  - истинная сила отрыва, дин;

$r$  - наружный радиус кольца, см.

Для того, чтобы выразить  $P$  в динах, следует данные, полученные в опыте и рассчитанные по формуле (3), разделить на 1000 для перевода миллиграммов в

граммы и умножить на 981 (1Г = 981 дин). Поэтому в работе удобно пользоваться формулой (4) в несколько измененном виде:

$$\delta_{\text{H}_2\text{O}} = \frac{P_{981}}{\pi D_{1000}} = \frac{P_{0,981}}{\pi D} \text{ дин/см} \quad (5)$$

Радиус платинового кольца заменяют его диаметром (D), во избежание лишних арифметических операций, так как непосредственно в опыте приходится измерять именно диаметр кольца (в см).

Учитывая зависимость поверхностного натяжения от температуры, значение последней следует обязательно записывать при проведении измерений.

### ***Работа 2. 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.

Уравнение (4) справедливо 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, сначала вычисляют отношение силы отрыва кольца от данной жидкости к силе отрыва кольца от воды при данной температуре

$$Q_{\text{найден.}} = \frac{P_x}{P_{\text{H}_2\text{O}}} \quad (6)$$

где  $P_x$  - сила отрыва от данной жидкости, мг;

$P_{\text{H}_2\text{O}}$  - сила отрыва от воды, мг

$Q_{\text{найден.}}$  связано с относительным поверхностным натяжением данной жидкости (относительным поверхностным натяжением называется отношение поверхностного натяжения данной жидкости к поверхностному натяжению

воды) зависимостью, которая выражается уравнением:

$$Q_{\text{истин.}} = (Q_{\text{найден.}} \times K) - K + 1, \quad (7)$$

где  $K$  - эмпирическая константа, экспериментально определяемая для каждого кольца (способ определения см. ниже).

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

$$Q_{\text{истин.}} = \frac{\delta_x}{\delta_{\text{H}_2\text{O}}}, \quad (8)$$

где  $\delta_{\text{H}_2\text{O}}$  - коэффициент поверхностного натяжения воды, дин/см;

$\delta_x$  - коэффициент поверхностного натяжения исследуемой жидкости.

Из уравнения следует:

$$\delta_x = \delta_{\text{H}_2\text{O}} \times Q_{\text{истин.}}$$

### ***Работа 3. Исследование поверхностной буферности плазмы крови.***

На часовое стекло помещают 0,5 см<sup>3</sup> плазмы крови и определяют ее поверхностное натяжение. Определение проводят два раза с интервалом 3 – 5 мин. После этого к плазме добавляют две капли 0,1% раствора олеата натрия, предварительно разбавленного в 10 раз физиологическим раствором. Определяют силу отрыва кольца сразу же после добавления поверхностно-активного вещества, а затем спустя 1, 3, 5, 10 и 15 мин. Точно такой же опыт проводят с физиологическим раствором (в качестве контрольного).

На основании полученных данных вычисляют изменение величины поверхностного натяжения во времени, откладывая на оси абсцисс время в минутах, а на оси ординат значения поверхностного натяжения.

### ***Работа 4. Определение константы кольца.***

Для определения константы кольца удобно пользоваться простым экспериментальным методом. Согласно этому методу определяют силу отрыва

кольца от воды и от какой-либо другой жидкости, абсолютное поверхностное натяжение которой можно найти в таблицах. Чаще всего для этой цели применяют 96° этиловый спирт или хлороформ.

Вычисление константы кольца К проводится по формуле:

$$K = \frac{Q_{\text{истин.}} - 1}{Q_{\text{найден.}} - 1} \quad (9)$$

Подставляя в уравнение (9) значения  $Q_{\text{истин.}}$  и  $Q_{\text{найден.}}$  получим:

$$K = \frac{\delta_x / \delta_{\text{H}_2\text{O}} - 1}{P_x / P_{\text{H}_2\text{O}} - 1} \quad (10)$$

Значение  $\delta_x$  (коэффициент абсолютного поверхностного натяжения спирта или другой взятой для определения жидкости при температуре опыта) находят в таблице ( $\delta_x$  хлороформа - 26 дин/см при 20° С).

### **Тема 3. ПРОНИЦАЕМОСТЬ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ**

Проницаемость — это способность клеток и тканей пропускать и поглощать растворы и газы из окружающей среды и выделять их наружу. Исследовать проницаемость – означает изучить процессы, происходящие на границе раздела между живым организмом и неживой окружающей средой. Знание механизмов проницаемости важно для понимания сущности обмена веществ, распределения веществ между различными образованиями внутри организма, возникновения биологических потенциалов и других процессов, как в норме, так и при патологических изменениях. Оценка проницаемости имеет важное общебиологическое значение и тесно связано с решением ряда практических задач физиологии и медицины.

Существуют следующие теории избирательной проницаемости клеток и тканей, по-разному трактующие субстрат и условия этого процесса. Согласно мембранной теории клеточной проницаемости распределение веществ между клеткой и средой объясняется наличием субмикроскопической мембраны, избирательно проницаемой для молекул и ионов. Протоплазма клеток считается коллоидом, в котором почти вся вода находится в свободном состоянии и обладает свойствами растворителя. В основе сорбционной теории

проницаемости лежит представление о протоплазме как о несмешивающейся с водой фазе, в которой вода и ионы находятся в связанном состоянии. Поступление веществ в клетку регулируется всей протоплазмой и определяется факторами сорбции (растворимостью, химическим связыванием, адсорбцией и др.). По современным представлениям клеточные мембраны состоят из двух параллельных слоев молекул фосфолипидов ( $\approx 50\%$ ), и белков ( $\approx 40\%$ ). В меньших количествах в состав мембраны входят другие липиды, холестерол и углеводы. Низкомолекулярные вещества, вода, газы могут проникать в клетку под действием осмотических сил, путем диффузии и ультрафильтрации, без энергетических затрат (пассивный перенос). Для ионов проницаемость зависит от электрического заряда, градиента потенциала между наружной и внутренней поверхностью мембран. Активным переносом обозначаются процессы, происходящие с затратой энергии, вырабатываемой в клетке в процессе метаболизма (фосфорилирование, дефосфорилирование, образование сложных комплексов веществ, наличие молекул-переносчиков, участие ферментов и т. д.). При этом вещества могут двигаться против градиента концентраций. Одним из способов проникновения веществ в клетку является пиноцитоз. Процесс этот заключается в адсорбции веществ клеточной оболочкой, уменьшении ее поверхностного натяжения и втягивании внутрь цитоплазмы с образованием пиноцитарных вакуолей; впоследствии их оболочка разрушается, и вещества включаются в клеточный метаболизм.

Исследовать проницаемость – означает изучить процессы, происходящие на границе раздела между живым организмом и неживой окружающей средой. Знание механизмов проницаемости важно для понимания сущности обмена веществ, распределения веществ между различными образованиями внутри организма, возникновения биологических потенциалов и других процессов. Нарушения проницаемости являются существенным звеном в патогенезе многих патологических процессов (аллергия, воспаление, отек, шок), в механизме изменений всасывания, секреции, экскреции, обмена веществ.

В основе проницаемости лежит явление диффузии, которое описывается законом Фика:

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

где  $m$  – количество вещества, г;  $t$  – время, сек;  $D$  – коэффициент диффузии,  $\text{см}^2 \cdot \text{сек}^{-1}$ ;  $S$  – площадь поверхности, перпендикулярной направлению диффузии,

см<sup>3</sup>;  $c$  – концентрация вещества, г х см<sup>-3</sup>;  $x$  – расстояние от исходной точки диффузии, см. Как видно из приведенной формулы, скорость диффузии  $dm/dt$  прямо пропорциональна площади поверхности, через которую происходит диффузия, концентрационному градиенту и обратно пропорциональна расстоянию.

Исследование проницаемости имеет важное общебиологическое значение и тесно связано с решением ряда практических задач физиологии и медицины. Наиболее удобны для исследования проницаемости пластинчатые органы и ткани. Кожа лягушки, обладающая односторонней проницаемостью, является классической моделью биологической мембраны. Она состоит из двух слоев: соединительно-тканного и эпителиального. Эпителиальный слой кожи лягушки обладает хорошими адсорбционными свойствами и имеет кислую реакцию. Следующий соединительный слой характеризуется слабощелочным значением среды и низкими адсорбционными свойствами. По-видимому, эти особенности определяют способность кожи лягушки избирательно пропускать вещества в том или в другом направлении.

Так, например, тионин, метиленовый синий и другие красители лучше проникают в направлении от соединительной ткани к эпителию. Основные красители (нейтральный красный) движутся в обратном направлении. При всякого рода воздействиях состояние кожи лягушки меняется, что оказывает влияние на ее одностороннюю проницаемость. В зависимости от рН раствора красителя и раствора омывающего кожу с другой стороны, односторонне движение того или другого вещества может быть ослаблено или усилено, а также изменено на противоположное.

### *Лабораторные работы.*

#### ***Работа 1. Исследование проницаемости кожи лягушки для метиленового синего***

*Ход работы:* Приготовить 0,65%-ный раствор хлористого натрия. На 0,65%-ном растворе хлористого натрия приготовить 0,05%-ный раствор метиленового синего. Обездвижить лягушку. С помощью ножниц вырезать лоскуты кожи со спины или брюшка. Лоскуты кожи укрепить на расширенных концах стеклянных цилиндров с помощью ниток или резинок. Закрепить на двух цилиндрах лоскуты кожи внутрь эпителием и на двух цилиндрах - эпителием наружу.



На стеклянные цилиндры надеть резиновые трубочки. Бюксы заполнить 0,65%-ным раствором хлористого натрия (10 мл). В стеклянные цилиндры с лоскутами кожи влить 0,65%-ный раствор хлористого натрия и убедиться в их герметичности. Затем вылить раствор хлористого натрия и налить по 2 мл раствора красителя. Подготовленные стеклянные цилиндры с лоскутами кожи и раствором красителя погрузить в бюксы с раствором 0,65%-ного хлористого натрия. Проследить, чтобы совпали уровни раствора хлористого натрия в бюксе и раствора красителя в стеклянном цилиндре. Кожные лоскуты в бюксах инкубировать 3 часа при температуре 22<sup>0</sup>С. С этой целью их надо поместить в предварительно подготовленный термостат. По истечении времени инкубации профотометрировать растворы, находящиеся в бюксах. Будут получены значения коэффициента поглощения полученного раствора метиленового синего в бюксе.

Концентрацию красителя в этих растворах необходимо определить с помощью градуировочных кривых, полученных на фотоэлектроколориметре. Для этого провести измерения коэффициента поглощения раствора метиленового синего разных концентраций и построить градуировочную кривую. Подробности измерения коэффициента поглощения приведены в описании к фотоэлектроколориметру.

Опыты повторить с лоскутами кожи, предварительно выдержанными в течение 30 минут в следующих растворах:

- 1) в дистиллированной воде;
- 2) в 70%-ном растворе этилового спирта;
- 3) в 0,93%-ном (0,125 М) растворе хлористого калия.

Результаты работы оформить в виде таблицы 1.

Табл. 1

Исследуемый объект	Количество прошедшего красителя			
	NaCl	H <sub>2</sub> O	70%-ный спирт	KCl
Эпителий внутри				
Эпителий наружу				

## Тема 4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ РАСТВОРОВ ПРИ ПОМОЩИ РЕФРАКТОМЕТРА

*Цель работы:* изучение принципа работы рефрактометра и исследование зависимости между показателем преломления раствора и концентрацией.

**Приборы и оборудование:** рефрактометр, пипетка, набор растворов различной концентрации.

Метод основан на сложной зависимости между показателем преломления раствора и концентрацией растворённых веществ. Значение показателя преломления раствора, определяемого при помощи рефрактометра, зависит от концентрации растворенного вещества и температуры. При неизменной температуре, показатель преломления линейно связан с концентрацией. Для сахарных растворов эта зависимость хорошо изучена и, как правило, отображается на шкале прибора, по которой непосредственно определяется концентрация сахара в растворе. Для определения концентрации какого-либо другого вещества (не сахара) пользуются эмпирической зависимостью между концентрацией этого вещества в растворе и его показателем преломления при фиксированном значении температуры.

Вследствие взаимодействия электромагнитной волны со средой, изменяется скорость её распространения. Эта зависимость имеет вид:  $v=c/n$ , где  $n=\sqrt{\epsilon\mu}$  - абсолютный показатель преломления вещества,  $v$  – скорость света в среде, а  $c$  – скорость света в вакууме. При переходе света через границу раздела двух сред, скорость распространения света в которых различна, происходит изменение его направления. Это явление называется преломлением или рефракцией света. Явление рефракции света легло в основу метода определения концентрации разбавленных растворов по эмпирической зависимости между показателем преломления и концентрацией раствора.

Относительный показатель преломления сред

$$n_{21}=n_2/n_1$$

где  $n_2$  и  $n_1$  - абсолютные показатели преломления сред.

При переходе света из среды с меньшим показателем преломления (оптически менее плотная среда) в среду с большим показателем преломления (оптически более плотная среда) угол падения луча больше угла преломления. Если луч падает на границу раздела сред под наибольшим возможным углом  $i=\pi/2$  (луч скользит вдоль границы раздела сред), то он будет преломляться под углом  $r<\pi/2$ . Этот угол является наибольшим углом преломления для данных сред и называется предельным углом преломления. Из закона преломления света следует:

$$n_{21} = \frac{\sin(\pi/2)}{\sin r_{\text{пр}}} = \frac{1}{\sin r_{\text{пр}}} = \frac{n_2}{n_1},$$

Откуда  $\sin r_{\text{пр}} = n_1/n_2$

Если свет переходит из оптически более плотной среды в оптически менее плотную, то угол преломления больше угла падения. При некотором угле падения  $i$  луча угол преломления равен  $\pi/2$ , т.е. преломлённый луч скользит вдоль границы раздела сред. При дальнейшем увеличении угла падения преломление не происходит, весь падающий свет отражается от границы раздела сред (полное отражение). Угол  $i$  называется предельным углом полного отражения и обозначается  $i_{\text{пр}}$ . Так как

$$n_{21} = \frac{\sin i_{\text{пр}}}{\sin(\pi/2)} = \frac{n_2}{n_1},$$

то  $\sin i_{\text{пр}} = n_2/n_1$

Таким образом, предельный угол преломления и предельный угол полного отражения для данных сред зависят от их показателей преломления. Это нашло применение в приборах для измерения показателя преломления веществ - рефрактометрах, используемых при определении чистоты воды, концентрации общего белка сыворотки крови, для идентификации различных веществ и так далее.

### Описание установки

Основной частью рефрактометра являются две прямоугольные призмы, сделанные из одного и того же сорта стекла. Призмы соприкасаются гипотенузными гранями, между которыми имеется зазор около 0,1 мм. Между призмами помещают каплю жидкости, показатель преломления которой требуется определить. Луч света от источника направляется на боковую грань верхней призмы и, преломившись, попадает на гипотенузную грань АВ. Поверхность АВ матовая, поэтому свет рассеивается и, пройдя через исследуемую жидкость, падает на грань CD нижней призмы под различными углами от 0 до 90°. Если показатель преломления жидкости меньше показателя преломления стекла, то лучи света входят в призму 2 (см. описание рефрактометра) в пределах от 0 до  $r_{\text{пр}}$ . Пространство внутри этого угла будет освещенным, а вне его – тёмным. Таким образом, поле зрения, видимое в зрительную трубу, разделено на две части: тёмную и светлую. Положение границы раздела света и тени определяется предельным углом преломления, зависящим от показателя преломления исследуемой жидкости.

Если исследуемая жидкость имеет большой показатель поглощения (мутная, окрашенная жидкость), то во избежание потерь энергии при прохождении света через жидкость измерения проводят в отраженном свете. Луч света от источника проходит

через матовую боковую грань  $CM$  нижней призмы 2. При этом свет рассеивается и падает на гипотенузную грань  $CD$ , соприкасающуюся с исследуемой жидкостью, под всевозможными углами от  $0$  до  $90^\circ$ . Если жидкость оптически менее плотная, чем стекло, из которого изготовлена призма, то лучи, падающие под углами, большими  $i_{пр}$ , будут испытывать полное отражение и выходить через вторую боковую грань нижней призмы в зрительную трубу. Поле зрения, видимое в зрительную трубу, так же как и в первом случае, окажется разделенным на светлую и тёмную части. Положение границы раздела в данном случае определяется предельным углом полного отражения, также зависящем от показателя преломления исследуемой жидкости.

С помощью этого прибора можно исследовать вещества, показатель преломления которых меньше показателя преломления стекла измерительных призм. В рефрактометре используется источник белого света. Вследствие дисперсии при прохождении светом призм 1 и 2 граница света и тени оказывается окрашенной. Во избежание этого перед объективом зрительной трубы помещают компенсатор. Он состоит из двух одинаковых призм, каждая из которых склеена из трех призм, обладающих различным показателем преломления. Призмы подбирают так, чтобы монохроматический луч с длиной волны  $\lambda = 589,3$  мкм. (длина волны желтой линии натрия) не испытывал после прохождения компенсатора отклонения. Лучи с другими длинами волн отклоняются призмами в различных направлениях. Перемещая призмы компенсатора с помощью специальной рукоятки, добиваются того, чтобы граница света и темноты стала возможно более чёткой.

Лучи света, пройдя компенсатор, попадают в объектив зрительной трубы. Изображение границы раздела свет – тень рассматривается в окуляр зрительной трубы. Одновременно в окуляр рассматривается шкала. Так как предельный угол преломления и предельный угол полного отражения зависят от показателя преломления жидкости, то на шкале рефрактометра сразу нанесены значения этого показателя преломления. Оптическая система рефрактометра содержит также поворотную призму. Она позволяет расположить ось зрительной трубы перпендикулярно призмам 1 и 2, что делает наблюдение более удобным.

В общей фокальной плоскости объектива и окуляра зрительной трубы помещают стеклянную пластинку, на которую нанесена визирная линия (или крест, образованный тонкими нитями). Перемещением зрительной трубы добиваются совпадения визирной линии с границей свет – тень и по шкале определяют показатель преломления исследуемой жидкости. В некоторых современных рефрактометрах зрительная труба укрепляется неподвижно, а система измерительных призм может поворачиваться.

### **Порядок выполнения работы:**

1. Подготовка прибора к работе:

а) расположите источник света так, чтобы наблюдения проводились в проходящем свете;

б) откиньте верхнюю призму рефрактометра и пипеткой нанесите на нижнюю призму 2-3 капли дистиллированной воды. Опустите верхнюю призму;

в) фокусируя окуляр, получите резкие изображения поля зрения, визира и шкалы;

г) перемещая зрительную трубу, получите в поле зрения границу свет – тень. Линия раздела должна быть резкой и без цветной окраски. Последнее достигается поворотом рукоятки компенсатора;

д) совместите визир с границей раздела свет – тень. При правильной настройке рефрактометра показание шкалы при этом должно соответствовать показателю преломления воды  $n = 1,333$  (при  $20^\circ \text{C}$ ).

2. Исследование зависимости показателя преломления раствора NaCl от концентрации:

а) измерьте показатели преломления  $n$  раствора NaCl различной концентрации  $C$ . Для этого на нижнюю призму нанесите поочередно растворы различной концентрации и, совмещая визир с границей раздела свет – тень, определите по шкале показатели преломления растворов. Для каждого раствора измерение показателя преломления производите 3 раза и найдите  $\langle n \rangle$ ;

1. Таблица 1

$C, \%$	$n_1$	$n_2$	$n_3$	$\langle n \rangle$

б) результаты измерений занесите в таблицу 1;

в) постройте график зависимости показателя преломления от концентрации

$$n = f(C);$$

г) измерьте показатель преломления  $n_x$  раствора неизвестной концентрации. Определите по графику концентрацию  $C_x$  этого раствора;

д) найдите по графику погрешность  $\Delta C_x$  измерения концентрации раствора.

3. Задание на усмотрение преподавателя.

Вопросы и упражнения для самоподготовки:

1. Сформулируйте законы отражения и преломления света.
2. Что называется предельным углом преломления?
3. В чем заключается явление полного отражения?
4. Что называется предельным углом полного отражения?
5. Опишите устройство рефрактометра.
6. Начертите ход лучей в рефрактометре в проходящем и отраженном свете.
7. С какой целью применяется рефрактометр в медико–биологических исследованиях?
8. Для чего гипотенузная грань верхней призмы делается матовой?
9. Чем определяется положение границы свет – тень в рефрактометре?
10. Определите, при каком угле падения луч, отраженный от границы раздела двух сред перпендикулярен преломленному лучу.
11. Найдите показатель преломления среды, если луч, преломленный на границе этой среды с воздухом перпендикулярен отраженному, а синус угла падения равен 0,8.

## **Тема 5. БИОЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ ПОТЕНЦИАЛЫ**

Многие процессы, протекающие как в животных, так и в растительных организмах сопровождаются возникновением электродвижущих сил в клетках и тканях и появлением биоэлектрических потенциалов.

Различают три основные группы биоэлектрических потенциалов: метаболические потенциалы; мембранные потенциалы и потенциалы повреждения (демаркационные потенциалы); потенциалы 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 (интенсивностью) обмена веществ. Примерами метаболических потенциалов могут служить разности потенциалов между наружной и внутренней поверхностью кожи лягушки, между стеблем и листом, кончиками корней и стволом и т.д.

К демаркационным относятся потенциалы, возникающие между интактным (то есть, целым) и поврежденным участками клетки или ткани (потенциалы

повреждения), а также разность потенциалов между наружной и внутренней поверхностью мембраны клетки (мембранные потенциалы). При этом, поврежденный участок и внутренняя среда клетки оказываются электроотрицательными по отношению к неповрежденному участку или наружной поверхности клеток. Мембранные потенциалы присущи всем живым клеткам. Мембранные потенциалы, которые имеются в возбудимых клетках, называют также потенциалами покоя. Величина мембранного потенциала в разных клетках колеблется от -50 до -85 мВ.

При раздражении возбудимых клеток заряд на их мембране меняется на противоположный и возникает потенциал действия (ПД), амплитуда которого может достигать 110 – 150 мВ. Между возбужденным и не возбужденным участками органа или ткани возникает разность потенциалов, причем возбужденный участок оказывается электроотрицательным по отношению к невозбужденному и, в результате, ПД получает способность распространяться на значительные расстояния без каких-либо изменений амплитуды.

По физико-химическим основам возникновения биоэлектрические потенциалы разделяются на потенциалы ионной природы (собственно биоэлектрические потенциалы) и окислительно-восстановительные потенциалы. Первые обусловлены неравномерным распределением ионов между цитоплазмой и внеклеточной средой, т.е. асимметрией распределения ионов (в основном, ионов  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Cl^-$ ). Вторые - 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.

Биоэлектрические потенциалы могут служить чувствительными показателями, характеризующими нормальные физиологические процессы в организме, а также патологические явления.

### **Регистрация биопотенциалов**

Величина биопотенциалов, в зависимости от объекта и способа отведения, может составлять сотни микровольт или единицы и десятки милливольт, но обычно не превышает 100-150 мВ. Для усиления и измерения постоянных потенциалов используются милливольтметры постоянного тока (при измерении значительных по величине потенциалов могут быть использованы лабораторные рН-метры). Для усиления и регистрации потенциалов действия используют специальные усилители биопотенциалов (УБП) и осциллографы.

Существует два способа отведения биопотенциалов: а) внеклеточный с помощью наружных электродов, б) внутриклеточный с помощью микроэлектродов.

Метод внутриклеточных отведений, с помощью специальных микроэлектродов, позволяет регистрировать разность потенциалов, существующих между внутренним содержимым клетки и окружающей средой. Микроэлектрод представляет собой тонкую стеклянную пипетку с диаметром кончика до 0.5 мкм, заполненную 2,5 М раствором КСl. Раствор электролита является проводящим электрический ток "стержнем", сама же пипетка служит изолятором этого проводника. "Стержень" – это электролитический мостик между цитоплазмой и системой отведения. Сопротивление таких электродов, вследствие незначительности диаметра кончика, может достигать 10-30 МОм (чем меньше диаметр кончика микроэлектрода, тем выше сопротивление электрода, но тем меньше повреждение клетки). Микроэлектрод, который связан с усилителем через хлорированную серебряную проволочку, вводится в клетку с помощью специального микроманипулятора.

Второй электрод (электрод сравнения) помещается в наружный раствор, который является хорошим проводником. Разность потенциалов, существующая между наружным раствором и внутренним содержимым клетки, называется мембранным потенциалом. Он регистрируется в момент прокола микроэлектродом мембраны клетки. Следует учесть, что при микроэлектродных исследованиях измеряется потенциал внутренней части клетки, а потенциал наружной среды принимается за нуль.



Если микроэлектрод не повредил клетку, то мембранный потенциал (потенциал покоя) может регистрироваться длительное время (рис.1).

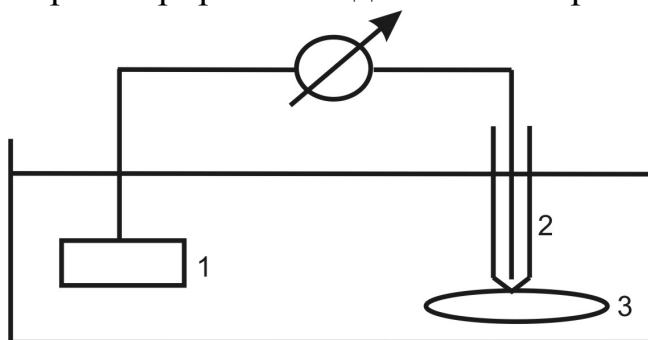


Рис. 1. Схема микроэлектродного отведения

1- электрод сравнения; 2- микроэлектрод; 3 - клетка

При внеклеточном отведении производится измерение разности потенциалов, которая возникает при повреждении или при возбуждении между различными частями клетки или между отдельными группами клеток. При внеклеточном отведении, измеряемая величина потенциалов всегда меньше, чем при микроэлектродном исследовании. Так, потенциал покоя волокон портняжной мышцы лягушки при микроэлектродном отведении составляет  $-90$  мВ, а при внеклеточном  $-30$  мВ и меньше. Величина потенциала покоя при внеклеточном отведении зависит от условий отведения, степени повреждения и т.д.

С помощью наружных электродов фактически регистрируется падение напряжения, создаваемое током, текущим между неповрежденным и поврежденным участками ткани, на сопротивлении проводящей среды  $R_1$  (рис.2)

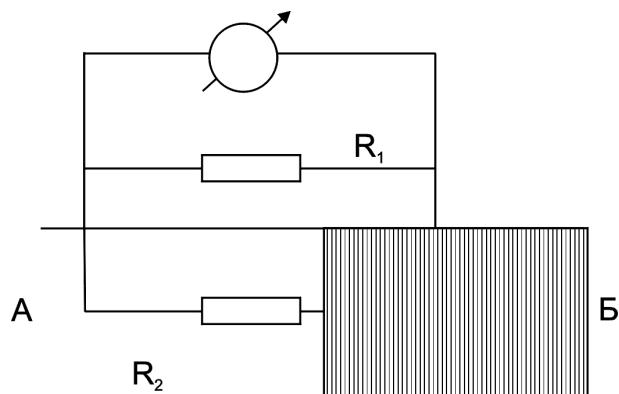


Рис. 2. Схема внеклеточного отведения потенциалов.

А - неповрежденный участок ткани:

Б - поврежденный участок ткани:

$R_1$  - сопротивление проводящей среды:

$R_2$  - сопротивление мембраны клетки и ее цитоплазмы.

Регистрируемый потенциал равен:

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

Таким образом, при внеклеточном отведении регистрируется та доля потенциала клетки ( $V_{\text{кл.}}$ ) которая определяется отношением  $R_2$  (сопротивление мембраны клетки и ее цитоплазмы) и  $R_1$  (сопротивление наружного раствора). Из приведенной формулы видно, что  $V$  тогда приближается к  $V_{\text{кл.}}$ , когда  $R_2/R_1$  стремится к нулю, т.е. когда  $R_1$  больше  $R_2$ .

Для увеличения сопротивления наружного раствора следует удалить его избыток с межэлектродного участка ткани (с помощью фильтровальной бумаги) и покрыть этот участок вазелиновым маслом (метод вазелинового мостика). Иногда для увеличения внешнего сопротивления применяют раствор сахарозы (метод сахарозного мостика), с помощью которого удается зарегистрировать до 95% величины исследуемого потенциала.

При регистрации постоянных биоэлектрических потенциалов отводящие электроды должны быть неполяризуемыми, т.е. не должны изменять свой

потенциал при прохождении через них электрического тока. Для биологических измерений обычно применяют электроды, покрытые слоем трудно растворимой соли этого же металла. К таким электродам относятся серебряные, покрытые слоем хлористого серебра (хлорсеребряные электроды), хлорированные платиновые электроды. Широко используются также цинковые ( $Zn - ZnSO_4$ ) и каломельные ( $Hg - Hg_2Cl_2$ ) электроды.

### *Лабораторные работы*

#### ***Работа 1. Измерение потенциала покоя нерва лягушки. Зависимость величины потенциала покоя от концентрации ионов калия в среде.***

*Ход работы:* Приготовить препарат изолированного седалищного нерва лягушки. После непродолжительного (10-15 мин) выдерживания в нормальном растворе Рингера, нерв поместить в камеру (Рис. 3), предварительно обсушив его на фильтровальной бумаге. Участок нерва между отделениями камеры А и Б покрыть смесью вазелина и вазелинового масла (вазелиновый мостик) для повышения межэлектродного сопротивления. Затем в отделения А и Б налить нормальный раствор Рингера и опустить в них отводящие электроды, закрепленные в держателях. К электродам подключить цифровой милливольтметр.

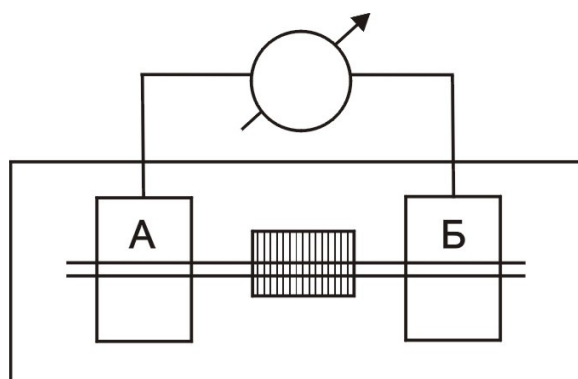


Рис. 3. Схема регистрации потенциала покоя нерва. Объяснения в тексте.

*Задание 1.* Измерить разность потенциалов между двумя интактными участками нерва. Эта разность обычно не превышает 3-5 мВ и связана с разностью потенциалов самих неполяризующихся электродов (асимметрией электродов).

Затем нормальный раствор Рингера в отделении Б заменить на

изотонический раствор хлористого калия или подвергнуть этот участок механическому повреждению (с помощью пинцета).

После стабилизации показаний записать величину потенциала покоя нерва.

*Задание 2.* Определить влияние повышенной концентрации ионов калия на величину потенциала покоя нерва.

Для этого нормальный раствор Рингера в отделении А заменить на раствор, в котором концентрация  $K^+$  увеличена в 4 раза. Записывать изменения величины потенциала покоя каждую минуту в течение 10-15 мин. Затем вновь заменить раствор в отделении А на нормальный раствор Рингера и подождать восстановления потенциала.

Повторить то же самое с изотоническим раствором КСl. Построить соответствующие графики изменения потенциала покоя нерва.

### ***Работа 2. Регистрация потенциала действия нерва лягушки.***

Установка для регистрации потенциала действия нерва состоит из осциллографа (1), усилителя биопотенциалов (2), и стимулятора (3) (Рис. 4).

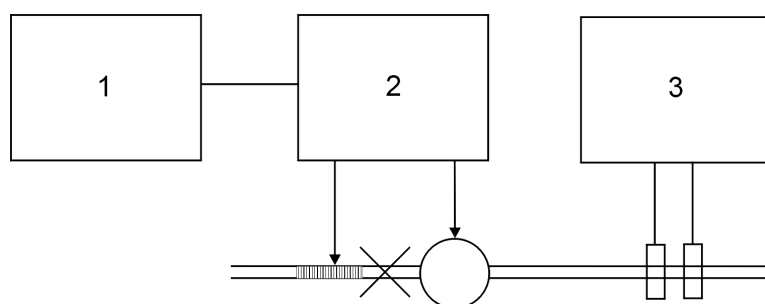


Рис. 4. Схема установки для регистрации потенциала действия нерва. Объяснения в тексте.

*Ход работы:* Отпрепарованный седалищный нерв лягушки обсушить на фильтровальной бумаге и поместить в камеру с "воздушным мостиком" между отводящими электродами. Заполнить отделения камеры нормальным раствором Рингера и опустить в них отводящие и раздражающие электроды.

*Задание 1.* Зарегистрировать потенциал действия между двумя интактными участками нерва (двухфазный ПД).

Включить стимулятор (частота раздражения 10-30 имп/с) и увеличивать

постепенно амплитуду стимула, для того, чтобы определить пороговую силу раздражения (минимальная сила, при которой на экране осциллографа появляется ПД). Затем определить максимальную силу раздражения, при достижении которой амплитуда ПД перестает увеличиваться, поскольку все нервные волокна вовлечены в активность.

Зарисовать потенциал действия и определить его амплитуду в милливольтках с помощью калибровочного сигнала.

*Задание 2.* Зарегистрировать потенциал действия между интактным и поврежденным (альтерированным) участками нерва (монофазный ПД).

Нанести механическое повреждение (с помощью пинцета) участку нерва, находящемуся под дистальным отводящим электродом (на рис. 4 заштрихован). Включить стимулятор и зарисовать регистрируемый потенциал действия. Отметить его отличие от двухфазного потенциала.

*Задание 3.* Влияние на потенциал действия хлористого калия.

Заменить нормальный раствор Рингера в отделении камеры под проксимальным электродом (на рис. 4 обозначена кружком) на изотонический раствор хлористого калия. Зарегистрировать изменения амплитуды ПД во времени и показать эти изменения графически. Проверить обратимость действия избытка ионов калия, вновь заменив раствор на нормальный.

***Работа 3. Измерение потенциала повреждения (потенциала покоя) мышцы лягушки.***

В работе используется измерительная установка, состоящая из цифрового милливольтметра и неполяризующихся электродов.

*Ход работы:* Отпрепаровать икроножную мышцу лягушки и поместить ее во влажную камеру. К мышце прикладывают электроды (межэлектродное расстояние 1,0 – 1,5 см) и измеряют разность потенциалов между двумя неповрежденными участками поверхности мышцы. Измеренная разность обычно не превышает 3-5 мВ и обусловлена асимметрией электродов.

Затем под одним из электродов ножницами повредить мышцу и определить разность потенциалов между неповрежденной и поврежденной поверхностью (потенциал покоя). Измерять разность потенциалов в течение 30 мин (каждые 5 мин). Затем на неповрежденный участок мышцы (под вторым электродом)

поместить ватку, смоченную изотоническим раствором хлористого калия. Измерения проводить до тех пор, пока разность потенциалов не упадет до нескольких мВ. По полученным результатам построить графики изменения потенциала покоя во времени и влияния на него раствора КСl.

## **Тема 6. МОДЕЛИРОВАНИЕ ЭЛЕКТРИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ВОЗБУДИМОЙ КЛЕТКИ**

### **1. Потенциал покоя**

**Потенциалом покоя (ПП)** называется разность электрохимических потенциалов между внутренней и наружной сторонами плазматической мембраны возбудимой клетки в состоянии покоя.

Для каждого типа клеток характерны свои постоянные значения потенциала покоя. ПП аксона кальмара составляет -65мВ, тогда как равновесный потенциал для  $K^+$  равен -100мВ, а для  $Na^+$  +41мВ. ПП представляет собой диффузионный потенциал ионов, пассивно перемещающихся через каналы в мембране по градиенту концентрации. При перемещении только ионов одного знака осуществляется перенос заряда на мембране и возникает разность потенциалов - мембранный потенциал (МП). Когда градиент электрохимического потенциала для данного иона на плазматической мембране достигает стационарного уровня (градиент концентрации и градиент потенциала уравниваются друг друга), система приходит в состояние равновесия. Равновесный потенциал может быть вычислен с помощью *уравнения Нернста* или *уравнения Гольдмана-Ходжкина-Катца*.

### ***Уравнение Нернста и уравнение постоянного поля Гольдмана-Ходжкина-Катца.***

Если два раствора с различными концентрациями ионов разделены проницаемой для ионов мембраной, то ионы будут перемещаться по своему концентрационному градиенту. Транспорт ионов приводит к возникновению на мембране градиента потенциала. Возникшая разность потенциалов оказывает влияние на транспорт ионов. Напряжение на мембране, при котором прекращается движение ионов по концентрационному градиенту - равновесный потенциал - может быть рассчитан по *уравнению Нернста*:

$$E_x = RT/zF \times \ln [X]_{out}/[X]_{in}$$

где R-газовая постоянная - 8.314 ВКл/Кмоль, F- постоянная Фарадея  $9.648 \times 10^4$  Кл/моль, T- абсолютная температура в Кельвинах, z-заряд иона,  $[X]_{in}$ ,  $[X]_{out}$  - концентрации иона X внутри и снаружи клетки, соответственно.

**Мембранным потенциалом покоя** (МПП) или **потенциалом покоя** (ПП) называют разность потенциалов покоящейся клетки между внутренней и наружной сторонами мембраны. Внутренняя сторона мембраны клетки заряжена отрицательно по отношению к наружной. Принимая потенциал наружного раствора за нуль, МПП записывают со знаком «минус». Величина МПП зависит от вида ткани, в состоянии покоя клеточная мембрана *поляризована*. Уменьшение величины МПП называют *деполяризацией*, увеличение — *гиперполяризацией*, восстановление исходного значения МПП — *реполяризацией* мембраны. Основные положения мембранной теории происхождения МПП сводятся к следующему. В состоянии покоя клеточная мембрана хорошо проницаема для ионов  $K^+$  (в ряде клеток и для  $Cl^-$ ), менее проницаема для  $Na^+$  и практически непроницаема для внутриклеточных белков и других органических ионов. Ионы  $K^+$  диффундируют из клетки по концентрационному градиенту, а непроницающие анионы остаются в цитоплазме, обеспечивая появление разности потенциалов через мембрану. Отметим, что E зависит не только от концентраций  $K^+$  и  $Na^+$  внутри и снаружи клетки, но так же и от *относительной проницаемости* для этих ионов. В состоянии покоя распределение  $Cl^-$  близко к равновесному и его концентрацию в уравнениях можно не учитывать.

В итоге устанавливается следующая картина. Внутри клетки создается большая концентрация ионов  $K^+$  и органических анионов, а снаружи обеспечивается большая концентрация ионов  $Na^+$  и  $Cl^-$ ). Другие пути транспорта ионов восстанавливают ионное равновесие, включая систему активного транспорта. Отметим разницу между понятиями проницаемость и проводимость. *Проницаемость* - это способность мембраны пропускать ионы, является свойством мембраны и не зависит от содержания ионов в окружающих растворах. *Проводимость* характеризует изменение потоков ионов при небольших сдвигах мембранного потенциала и зависит и от проницаемости, и от содержания иона в среде. Например, мембрана, проницаемая для ионов  $K^+$ , будет обладать очень низкой проводимостью по  $K^+$  при отсутствии этих ионов в среде.

## 2. Потенциал действия

Основная функция нервной клетки заключается в обеспечении процесса генерации и распространения возбуждения в самой клетке и между разными клетками. Процесс возбуждения нервных и мышечных клеток связан с быстрым обратимым изменением мембранного потенциала и носит название *потенциала действия* (ПД).

Генерация потенциала действия происходит в том случае, если раздражение нанесенное на возбудимую клетку, снижает ее мембранный потенциал (по абсолютной величине) до определенного, т.н. критического уровня. Такая реакция на изменение МП происходит благодаря тому, что натриевая проводимость мембраны зависит от МП. При МП на уровне ПП величина натриевой проводимости очень мала. При снижении МП – *деполяризации* – происходит увеличение натриевой проводимости, в результате чего натрий начинает поступать внутрь клетки, что способствует еще большему снижению уровня МП. Это в свою очередь ведет в еще большему увеличению проводимости для  $\text{Na}^+$  Возбудимые клетки способны достаточно быстро (резко) изменять мембранный потенциал вплоть до изменения знака. Такой выброс потенциала именуется потенциалом действия или нервным импульсом. Еще Ходжкином и Хаксли, а также Колом и Куртисом было найдено, что на пике ПД происходит кратковременная смена знака потенциала. Для определения уровня возбудимости нервной клетки важное значение имеют такие параметры как порог генерации ПД и критический уровень деполяризации. Теоретически при возбуждении МП должен достигнуть уровня равновесного потенциала для натрия, уравнивающего  $\text{Na}^+$  - концентрационный градиент. Однако на практике этот уровень никогда не достигается. Нарастание проводимости мембраны для  $\text{Na}^+$  идет быстро и достигает максимума при положительном МП, однако затем быстро снижается до нуля. Быстрое снижение  $\text{Na}^+$ -тока связано с развитием процесса натриевой инактивации. Это явление связано с особенностями ионных каналов, обеспечивающих натриевую проводимость.

**Фазы потенциала действия:** Сначала идет нарастание (относительно медленное) деполяризации мембраны в ответ на ВПСП, затем следует крутое нарастание до пика амплитуды (его разница с нулевым потенциалом называется овершутом). В этот момент наступает реверсия потенциала – обращение знака потенциала. Затем следует спад потенциала, сменяющийся следовой гиперполяризацией и переход в основное состояние мембраны. Порог генерации потен-



циала действия (или просто порог) – минимальная величина потенциала мембраны, необходимая для возникновения потенциала действия. Овершут – это превышение пика амплитуды потенциала действия над нулевым значением потенциала мембраны. Все потенциалы действия генерируются по принципу «все или ничего» независимо от силы стимула, который его вызвал, но стимул должен быть достаточной силы, чтобы преодолеть порог. Есть рефрактерный период, когда потенциал действия невозможно вызвать.

**Распространение нервного импульса по нервному волокну.** Чтобы сигнал (информация) достиг интегративного нейрона в нейронной сети он должен распространиться (пройти) по аксону до постсинаптического нейрона. На аксоне и нервных волокнах генерация ПД, как и в нейроне, определяется разновременной динамикой активации и инактивации натриевых и калиевых каналов, что ведет к открытию и закрытию ионных каналов. Принцип перемещения нервного импульса построен на поперечной диффузии ионов натрия и калия через мембрану, что приводит к сдвигу потенциала вдоль волокна, происходит формирование локальных токов, которые являются движущей силой распространения нервного импульса. Имеется существенное различие распространения нервного импульса по миелинизированному и немиелинизированному волокнам. Переосаживание нервного импульса от одного перехвата Ранвье миелинизированного волокна к другому существенно ускоряет распространение ПД.

### **Краткое описание работы модели**

Настоящая модель создана исходя из предположений впервые предложенных и формализованных А.Ходжкиным и А.Хаксли в 1952. В данном случае используется одна из модифицированных систем, известная как однокомпарментная. В отличие от реальных клеток в данной модели все ионные потоки пересекают мембрану в одном участке и не рассматриваются активные или пассивные процессы переноса ионов вдоль клетки или диффузии из рассматриваемого компартмента. Хотя эта модель представляет собой довольно грубое упрощение реального процесса функционирования нейронов, поведение выбранной однокомпарментной модели все же напоминает функционирование нервной клетки, а также значительно быстрее анализируется, что важно для понимания элементарных процессов нейрофизики.

Для успешного моделирования ионных токов в нейронах необходимо знать следующее:

1. потенциал реверсии,

2. зависимость активации и инактивации от потенциала,
3. кинетика активации и инактивации при различном значении МП,
4. максимальная проводимость клетки (какой будет общая проводимость при всех открытых каналах).

Эти параметры (разные значения) заложены в модель, изменяя их можно получить разные формы ответа нервного волокна на приложенный стимулирующий ток, а также кинетику входящего (натрий) и выходящего (калий) тока.

### **Компьютерная обработка модели**

*Метод фиксации потенциала.* При выполнении экспериментов по фиксации потенциала на настоящих нейронах величина тока, прикладываемого с помощью электродов, устанавливается таким образом, чтобы напряжение на плазматической мембране нейрона оставалось постоянным. Этот прием используется при описании различных потенциалозависимых и кинетических характеристик мембранного тока. Результаты предсказанные моделью хорошо описывают поведение нейрона в «реальной жизни». В нашем случае компьютерная модель в условиях фиксации потенциала на мембране нейрона предполагает наличие абсолютной фиксации на всем протяжении нейрона и одинаковый ответ всех участках мембраны клетки (однокомпарментная модель). В данной модели нейрональные токи уравновешены за период, предшествующий приложению разности потенциалов, что может наблюдаться и в «реальном» нейроне, если МП будет удерживаться на определенном уровне в течение периода времени, большего, чем скорость активации, дезактивации, инактивации или дезинактивации тока в канале.

#### ***Опыт 1: Равновесный потенциал***

Первый эксперимент демонстрирует динамику развития ПП на мембране гигантского аксона кальмара. В предлагаемой модели мембрана проницаема для двух ионов -  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$ . Известно, что проницаемость этих ионов ( $pK_{\text{leak}}$  и  $pNa_{\text{leak}}$ ) определяет параметры ПП клеточной мембраны, который можно рассчитать по уравнению Гольдмана-Ходжкина-Катца. Термин «утечка» (leak) отражает тот факт, что проницаемость мембраны для этих ионов не меняется при варьировании МП, хотя и вносит существенный вклад в величину ПП. Для того, чтобы промоделировать влияние проницаемости по  $\text{K}^+$  и  $\text{Na}^+$  на ПП, нужно нажать клавишу «R» (Return) и вернуться в меню (это необходимо делать после каждой

операции моделирования). Далее переместите курсор к  $pNa_{leak}=0.06$ , а потом замените фиксированное значение на другое (скажем 0) и нажмите «В» (begin, для начала моделирования). Обратите внимание, что МП быстро меняет свое значение с -65 мВ на -100 мВ, что соответствует равновесному потенциалу для  $K^+$ . На самом деле, содержание  $K^+$  гораздо больше внутри клетки, чем снаружи и в ходе моделирования изменений ПП при фиксации МП на уровне -65 мВ, ионы перемещаются по градиенту концентрации (выходят из клетки). Важно отметить, что в данном случае, наблюдается перемещение ионов через мембрану при МП далеких от равновесного потенциала. Число переносимых ионов в действительности очень мало в сравнении с их концентрацией в клетке или омывающей среде и поэтому изменения концентраций иона с обеих сторон мембраны незначительны.

### ***Опыт 2: Влияние изменения концентраций ионов на ПП***

Нажмите клавишу «R» и измените внеклеточные концентрации  $K^+$ ,  $[K^+]_o$ . Например, замените исходное значение концентрации ионов калия на 135мМ, так чтобы  $[K^+]_o$  стала равной  $[K^+]_i$ . Используйте клавишу Y (overlay), чтобы добиться сопоставления картины этой и предыдущей модели. Отметим, что теперь величина МП становится равной 0мВ, поскольку отсутствует трансмембранный градиент концентрации для  $K^+$ . Чтобы изучить вклад в формирование МП проводимости мембраны только для  $Na^+$ , нажмите «O» (open) и перезагрузите REST.CCS файл. Нажмите клавишу «В» для повторения эксперимента при контрольных условиях (т.е. при нормальных величинах проницаемости  $Na^+$  и  $K^+$  в состоянии покоя). Теперь выбрав  $pK_{leak}=1$  и, изменив фиксированное значение на 0, вы можете нивелировать вклад  $K^+$  в МП. Нажав Y, Вы обнаружите, что величина МП устанавливается на уровне равновесного потенциала для  $Na^+$  (+41 мВ). В случае, когда через плазматическую мембрану возбудимой клетки проникает более одного иона, МП становится пропорционален сумме равновесных потенциалов и относительных проницаемостей мембраны для каждого из этих ионов. Это можно проверить, меняя  $pNa_{leak}$  и  $pK_{leak}$ . Выберите  $pK_{leak}=0$  и измените это значение на 10. Нажав «В» Вы обнаружите, что МП теперь гораздо ближе к  $E_K$  (-100 мВ), чем при  $pK_{leak}=1$ . Известно, что в норме ПП определяется главным образом распределением, т.к. мембрана более проницаема для  $K^+$ , чем для  $Na^+$ .

Вопросы:

1. Какие два фактора влияют на транспорт ионов через мембрану?
2. Что обозначают термином «равновесный потенциал» для отдельного иона?
3. Почему равновесный потенциал для  $K^+$  -100 мВ, а для  $Na^+$  +41 мВ, хотя оба являются положительно заряженными ионами?
4. При нормальных условиях МП= -65 мВ. Каким он будет, если установить обратные концентрации  $K^+$  и  $Na^+$  по разные стороны мембраны? Запустите REST.CCS и измените концентрации одновременно  $Na^+$  и  $K^+$  на обратные, проверьте правильность своего ответа.
5. Запустите PASSIVE.CCS и выясните, что произойдет с МП в ответ на деполяризующий импульс, если удвоить и  $pK_{leak}$ , и  $pNa_{leak}$ ? Проверьте правильность ответа. Объясните результат.

### ***Опыт 3: Метод фиксации потенциала для анализа токов $Na^+$ и $K^+$***

Для воспроизведения эксперимента Ходжкина и Хаксли по фиксации мембранного потенциала клетки, выйдем из программы C-CLAMP (нажмите «Q» (quit) в меню). Для выполнения экспериментов выберите файл V-CLAMP в командной строке DOS. Нажмите клавишу «O» и загрузите Na\_K.VCS (далее нажмите «B»). В этом модельном опыте Вы меняете МП от -100 мВ до 0 мВ, определяя силу тока, которую нужно приложить к аксону для фиксации стационарной величины МП. В такой ситуации регистрируемый ток эквивалентен току через ионные каналы. Отметим, что в ходе эксперимента сначала наблюдается ток, направленный внутрь (ток положительно заряженных ионов в клетку), а затем - наружу.

### ***Опыт 4: Влияние изменения концентрации ионов на ионные токи***

Заменяем внеклеточную концентрацию  $Na^+$ , приравняв ее к внутриклеточной (введите  $[Na^+]_o=30$ ). Поскольку в этом эксперименте концентрации ионов  $Na$  по обе стороны мембраны выравнены, то равновесный потенциал для этого иона стал равным 0 мВ и при заблокированном токе  $Na^+$  можно будет наблюдать только ток  $K^+$ . Теперь восстановим исходное значение для  $[Na^+]_o=145$  и заменим  $[K^+]_i$  с 135 мМ до 3.1 мМ (блок  $K^+$ -тока). Нажатием клавиши «B» Вы наглядно

убедитесь в генерации в этих условиях только  $\text{Na}^+$ -тока. Обратите внимание, что  $\text{Na}^+$  - и  $\text{K}^+$  - токи отличаются по ряду признаков:  $\text{Na}$ -ток активируется быстрее и инактивируется при постоянном МП, в то время как  $\text{K}$ -ток не инактивируется. Это доказывает то, что  $\text{Na}$ -ток является инактивирующимся, а  $\text{K}$ -ток неинактивирующимся. Данный факт обусловлен различиями в строении этих потенциалозависимых каналов.

### ***Опыт 5: Зависимость $\text{Na}$ - и $\text{K}$ - токов от потенциала***

Далее рассмотрим зависимость проницаемости этих двух ионных токов от МП более детально. При выполнении этого модельного эксперимента будем последовательно прикладывать к мембране различный потенциал и оценивать изменения кинетики величины тока. Нажмите «О» и загрузите файл `Na_K_IV.VCS`. Далее используйте клавишу «I» (individual steps) каждый раз после проведенной симуляции. Каждое нажатие клавиши увеличит МП аксона на 10 мВ, что позволит Вам воспроизвести данные, полученные на перехвате Ранвье аксонов Б. Хиллом.

Для проведения следующего исследования воспользуемся рядом фармакологических препаратов (ингибиторный анализ), которые селективно блокируют  $\text{Na}$  и  $\text{K}$  - токи. Известно, что тетродотоксин (ТТХ), выделенный из рыбы фугу, высокоэффективно и селективно блокирует  $\text{Na}$ -токи. С помощью модели можно воспроизвести блокирование каналов, снижая максимальную проводимость для  $\text{Na}^+$  ( $g_{\text{Na}}$  (mS)) до 0. После блока  $\text{Na}$ -тока несколько раз нажмите «I» и обратите внимание на изменения амплитуды и длительность  $\text{K}$ -тока. Затем снова установите  $g_{\text{Na}}=10$ .

Теперь рассмотрим следующий фармакологический препарат тетраэтиламмоний (ТЭА), который является блокатором  $\text{K}$ -каналов. Его действие на аксон можно моделировать, установив  $g_{\text{K}}=0$ . Опять несколько раз нажмите «I» и обратите внимание на амплитудную и временную зависимость изолированного  $\text{Na}$ -тока.

Вопросы:

1. Какой ион играет определяющую роль в развитии фазы деполяризации при генерации ПД, а какой - в развитии фазы реполяризации? Как движутся эти ионы - внутрь или наружу?

2. Что означают термины активация и дезактивация? Инактивация и дезактивация? Насколько это важно при рассмотрении Na-тока при генерации ПД?

3. Сравните скорости активации Na- и K- токов. (Можно воспользоваться V-CLAMP Na\_K.VCS). Какой ток, Na- или K-ток, активируется при более отрицательных значениях МП? (V-CLAMP Na\_K\_IV.VCS). Почему это важно для процесса генерации ПД?

4. Почему величина ПД не достигает значений равновесного потенциала для Na<sup>+</sup>? (внимательно изучите ионные токи в ACTN\_POT.CCS)

5. Какие четыре фактора определяют амплитуду ионных токов в любой момент времени?

### 1. Запустить программу «Synapse»

Первая часть работы выполняется по программе *Simulation* для получения контрольных показателей.

2. Нажать кнопку *Simulation* и выбрать *Presynapse* или *Postsynapse* для активации модели нервной терминали. Стимуляция первого перехвата нервного волокна производилась толчком тока длительностью 0.1 мс, плотность тока составила 20 мА/см<sup>2</sup>.

3. Выбрать необходимый график и зарисовать полученные результаты. Графики показывают изменения параметров потенциалов по ходу волокна или нервной терминали.

Action Potentials - график потенциала действия, Membrane Currents – график мембранных токов, Na, K, Ca, K(Ca), Leakage – графики натриевых, калиевых, кальциевых, кальций-активируемых калиевых токов и токи утечки. Postsynapse – график токов и потенциала концевой пластинки. Extracellular recording – график изменений биопотенциалов нервного окончания при внеклеточном отведении.

Вторая часть работы выполняется по программе *Parameters*, которая позволяет изменить параметры нервного волокна и ионных каналов.

*Common* - общие свойства нервного волокна, *Na*, *K*, *Ca*, *K(Ca)*, *Leakage conductance* – параметры натриевой, калиевой, кальциевой, кальций-активируемой калиевой проводимости и проводимость утечки.

3. Изменить параметры нервного волокна и ионных каналов. Нажать *OK* для запоминания параметров или *Restore* для возврата стандартных параметров.

4. Нажать кнопку *Simulation* и выбрать *Presynapse* или *Postsynapse*.

5. Выбрать необходимый график и зарисовать полученные результаты. Сравнить результаты с контрольными графиками. Объяснить полученные результаты.

Параметры вкладок:

*Common*

$C_m$  – емкость мембраны,  $R_m$  - удельное сопротивление мембраны,  $E_r = -70\text{mV}$  мембранный потенциал покоя,  $r_i$  - удельное сопротивление аксоплазмы, Radius – радиус волокна,  $C_{\text{myelin}}$  - емкость миелина,  $V$  - потенциал относительно потенциала покоя мембраны,  $a$  - радиус волокна,  $I_{\text{st}}$  – плотность тока, Length – длина волокна. **Остальные параметры не изменять.** Ranvier node – перехват Ранвье, Spread – развертка.

*Na conductance*

$g_{\text{Na}}$  – ионная проводимость для натрия,  $V_{\text{Na}}$  – равновесный потенциал для ионов натрия,  $\lambda$  – постоянная длины волокна,  $m$  и  $h$  – переменные активации и инактивации натриевой проницаемости,  $a$  и  $b$  константы скоростей переменных  $m$  и  $h$ .

*K conductance*

$g_{\text{K}}$  – ионная проводимость для калия,  $V_{\text{K}}$  – равновесный потенциал для ионов калия,  $\lambda$  – постоянная длины волокна,  $n$  – переменная активации калиевой проницаемости,  $a$  и  $b$  константы скоростей переменной  $n$ ,

*Ca conductance*

$P_{\text{Ca}}$  – коэффициент проницаемости мембраны для ионов кальция,  $\lambda$  – постоянная длины волокна,  $[\text{Ca}]_i$  – концентрация ионов кальция в цитоплазма,  $[\text{Ca}]_o$  – внеклеточная концентрация ионов кальция (должна быть не менее, 0,8),  $k_1$  и  $k_2$  – коэффициента кальциевой проницаемости.

*KCa conductance*

$P_{\text{KCa}}$  – коэффициент проницаемости мембраны для ионов калия через кальций-активируемые калиевые каналы,  $\lambda$  – постоянная длины волокна,  $[\text{Ca}]_i$  – концентрация ионов кальция в цитоплазма,  $[\text{Ca}]_o$  – внеклеточная концентрация ионов кальция (не менее 0,8).

*Leakage conductance*

$g_{\text{L}}$  – ионная проводимость для ионов утечки,  $V_{\text{L}}$  – равновесный потенциал для ионов утечки,  $\lambda$  – постоянная длины волокна.

## Тема 7. БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ

Биолюминесценция представляет собой частный случай люминесценции - свечения различных веществ (люминофоров) при поглощении энергии.

В соответствии с источниками энергии все люминесцирующие вещества разделяются на хемилюминофоры, электролюминофоры и фотоллюминофоры. В дальнейшем речь пойдет только о последних. Для того, чтобы заставить фотоллюминофор светиться, необходимо облучить его ультрафиолетовым светом (УФ-светом) или коротковолновыми лучами видимого света. В результате молекулы люминофора переходят в возбужденное состояние, а затем через более или менее продолжительный промежуток времени возвращаются в исходное состояние, испуская при этом квант света.

В окружающей нас природе встречается немало число естественных люминофоров. Вот как описывается это в книге, изданной под редакцией М.А. Константиновой-Шлезингер «Люминесцентный анализ» "Дадим на мгновение волю фантазии: представим себе, что к атмосфере, окружающей Землю, примешан воображаемый "черный газ"- такой газ, который целиком поглощал бы всю видимую часть солнечного спектра, но не ослаблял бы интенсивности тех УФ-лучей, которые достигают нашей Земли. Если бы это случилось, наш взор был бы поражен неожиданным зрелищем. Земля погрузилась бы в полный мрак, однако, среди окружающей тьмы, мы увидели бы сказочный мир разнообразно светящихся предметов. В темноте мы не смогли бы уловить контуров тела человека, но резко вырисовывались бы ослепительно белые зубы, а на концах пальцев ясно обозначались бы сине-голубые ногти. Многие минералы нам представлялись бы окрашенными: флюорит (плавиковый шпат) казался бы фиолетовым, кальцит - красным. ортоклаз - желтым и т.д; быть может наше внимание привлек бы камень неопикуемой красоты, усеянный по коричнево-серому фону зелеными сияющими блестками уранового соединения. Мы в темноте увидели бы семена некоторых растений: кажущиеся на изломе красными зерна вики, коричневые зерна пелюшки, овса, различающиеся по цвету в зависимости от сорта, и т.д. Мы были бы удивлены обилием цветных точек, рассеянных среди луга,- это небольшие участки на цветах многих растений, например, медовые железки у основания венчика.

Лист белой бумаги в зависимости от ее сорта казался бы нам синим, фиолетовым или был бы невидимым. Разлитая по земле нефть напоминала бы



лужу грязного молока. Пятна керосина и некоторых минеральных масел мы приняли бы, пожалуй, за пятна синей краски различных оттенков – так ярко вырисовывались бы они в темноте благодаря своему свечению".

В приведенном отрывке речь шла о природных люминофорах - представителях как неорганического (минералов), так и органического мира (семян и цветов растений, нефтепродуктов). Разница между этими двумя типами люминофоров заключается отнюдь не в том, что в состав одних входит углерод, а в состав других - нет. Здесь имеются и более принципиальные различия. Неорганические люминофоры (их часто именуют кристаллофосфорами) люминесцируют лишь в твердом состоянии. Механизм их свечения требует наличия кристаллической решетки строго определенного строения, в которую обязательно входят активирующие примеси. Совсем иная картина наблюдается в случае органических люминофоров, у которых люминесцируют отдельные молекулы. Такое происхождение свечения позволяет органическим веществам люминесцировать и в твердом виде, и в растворах, и в парах. В дальнейшем речь пойдет преимущественно о люминесценции органических соединений. Именно с ними чаще всего приходится сталкиваться медикам, биологам и экологам.

В зависимости от длительности свечения различают два случая люминесценции органических веществ: флуоресценцию - свечение люминофора, прекращающееся сразу с окончанием действия возбуждающего света; фосфоресценцию – свечение, продолжающееся заметное время после прекращения возбуждения. На самом деле флуоресценция и фосфоресценция отличаются друг от друга не только длительностью свечения. Более глубокое различие состоит в том, что при этих процессах испускание квантов света происходит из различных энергетических уровней возбужденной молекулы.

Какую же химическую природу должны иметь органические соединения, чтобы обладать люминесценцией? Хотя изучение механизмов люминесценции, начавшееся с работы английского физика Д.Стокса в 1852 г., идет уже более 130 лет, окончательный ответ еще не получен. Однако множество наблюдений показывает, что в большинстве случаев люминесцируют те органические молекулы, в состав которых входят чередующиеся одинарные и двойные связи между атомами углерода. Химики часто называют такие связи сопряженными, сопряженной именуют и всю структуру этих молекул. Из природных люминесцирующих соединений, встречающихся в некоторых растениях, сопряженными структурами обладают, например, витамин А и умбеллиферон (производное кумарина;

обнаружен в большом количестве растений - в основные семейства зонтичных, а также рутовых и сложноцветных).

Естественным люминофором растений является зеленый пигмент хлорофилл. Хлорофилл имеет темно-красную люминесценцию, что объясняется сопряженной структурой входящего в его состав порфиринового цикла.

### *Люминесцентный анализ*

Под люминесцентным анализом понимают обнаружение и исследование различных объектов и процессов с помощью люминесценции, которое предполагает наблюдение за свечением объектов визуально (люминесцентная микроскопия) или с помощью приборов (флюориметры, спектрофлюориметры).

Люминесцентный анализ обладает исключительной чувствительностью ( $10^{-10}$ – $10^{-12}$  Г). (Чтобы яснее представить себе ничтожность этих величин, зададимся целью пометить люминесцентным методом каждого из 4,5 миллиардов жителей нашей планеты. Для этого понадобится всего 0,45 Г люминофора.)

Люминесцентный (флуоресцентный) анализ представляет собой один "из наиболее широко используемых во всех областях (от геологии до криминалистики) и перспективных методов исследования. Медики и биологи стали использовать его одними из первых. Еще в работе Д.Стокса (1852) подробно описаны свечение хинина, хлорофилла и других веществ растительного происхождения. Впоследствии была обнаружена собственная люминесценция некоторых белков (альбумин бычьей сыворотки, белок вируса табачной мозаики, рибонуклеаза и др.).

Широкие возможности использования люминесцентного анализа в различных областях биологии и медицины появились с открытием, а затем и с направленным синтезом веществ – (люминофоров, флюорохромов, флуоресцентных меток), специфически связывающихся с различными структурными компонентами живой клетки. Так, например, акридиновый оранжевый – один из самых популярных и давно используемых красителей для люминесцентной микроскопии, обладает весьма интересным свойством – полихромазией, т.е. способностью неодинаково связываться с различными клеточными структурами, придавая им отличное по цвету свечение (ДНК дает зеленую флуоресценцию, РНК – красную).

## *Лабораторные работы*

### **1. Знакомство с устройством и работой люминесцентного микроскопа МЛ- 2**

Внимательно прочитайте инструкцию к микроскопу.

**ВНИМАНИЕ!** Включение микроскопа производится только с преподавателем. Студенты допускаются к работе с микроскопом только после ознакомления с техникой безопасности.

### **2. Изучение люминесценции хлорофилла**

Работа проводится с использованием водных растений (хлорелла, сценодесмус, нитчатка, элодея. Для исследования можно использовать и другие растительные объекты (например, срез иглы хвойных растений).

*Ход работы:* а). Каплю взвеси одноклеточных водорослей, листочек элодеи или другого растения помещают на предметное стекло, прикрывают покровным и помещают на предметный столик. Наблюдение проводят сначала при малом увеличении (объектив x10). Затем, при большем увеличении рассматривают структуру хлоропластов и отмечают особенности свечения разных растительных объектов.

Следует обратить особое внимание на «эффект выжигания» (снижение интенсивности свечения и изменение цвета флуоресценции при длительном воздействии возбуждающего света).

б). Определяют изменение флуоресценции хлорофилла после воздействия на растение токсическим веществом (например, раствором медного купороса).

### **3. Изучение люминесценции нервных волокон, окрашенных акридиновым оранжевым**

*Ход работы:* Седалищный нерв лягушки помещают на предметное стекло и, с помощью препаровальной иглы, разделяют на волокна. На препарат наносится капля раствора акридинового оранжевого (концентрация 1 : 1000, 1 : 10000). Через 5 минут препарат осторожно промывают, капая на него раствором Рингера, и покрывают покровным стеклом.

Наблюдение начинают при малом увеличении. Обращают внимание на форму ядер Шванновских клеток у различных по диаметру нервных волокон.

# ОСНОВНЫЕ БИОФИЗИЧЕСКИЕ ФОРМУЛЫ И КОНСТАНТЫ

## 1. Теория информации и регулирования:

$$H = -\sum_{i=1}^{i=n} P_i \log_2 P_i \quad \text{- уравнение Шеннона}$$

$$H = \log_2 \frac{P}{P_0} \quad \text{- вычисление информации}$$

$$T = H(x) + H(y) - H(x,y) \quad \text{- количество трансформации}$$

$$C = \frac{T}{\tau} \quad \text{- мощность канала}$$

Пропускная способность канала:

телевизионный канал  $7 \times 10^7$  бит  $\text{с}^{-1}$

телефон  $5 \times 10^4$  бит  $\text{с}^{-1}$

глаз  $3 \times 10^6$  бит  $\text{с}^{-1}$

ухо  $4 \times 10^4$  бит  $\text{с}^{-1}$

## 2. Термодинамика биологических систем:

$$\Delta Q = \Delta U + A \quad \text{- 1-й закон термодинамики}$$

$$\Delta F = \Delta U - T\Delta S \quad \text{- вычисление свободной энергии системы}$$

$$\Delta S \geq \frac{\Delta Q}{T} \quad \text{- 2-й закон термодинамики}$$

$$\Delta H = \Delta U + p\Delta V \quad \text{- энтальпия}$$

$$S = k \ln w \quad \text{- уравнение Больцмана}$$

$$\frac{dS}{dt} = \frac{d_e S}{dt} + \frac{d_i S}{dt} \quad \text{- скорость изменения энтропии в открытой системе}$$

$$0 < \frac{d_i S}{dt} = \min \quad \text{- уравнение Пригожина}$$

$$T \frac{d_i S}{dt} = N_{\text{вх.}} - N_{\text{вых.}} = J \times X \quad \text{- изменение мощности процесса}$$

$$J_1 = L_{11}X_1 + L_{12}X_2 \quad \text{- уравнения взаимности Онзагера}$$

$$J_2 = L_{21}X_1 + L_{22}X_2$$

### 3. Кинетика биологических процессов:

$$V = - \frac{dA}{dt} = kA_0 e^{-kt} \quad \text{- скорость реакции}$$

$$k = \rho \times z \times e^{-E_a/RT} \quad \text{- уравнение Аррениуса}$$

$$Q_{10} = \frac{V_{T+10}}{V_T} \quad \text{- температурный коэффициент Вант-Гоффа}$$

Для физических процессов  $Q_{10} \approx 1$  (диффузия – 1,1 – 1,2); для ферментативных реакций – 1,7; для химических процессов – 2 – 4.

$$V = \frac{V_0 C}{k+C} \quad \text{- уравнение Михаэлиса-Ментен}$$

### 4. Проницаемость биологических мембран

$$\frac{dm}{dt} = -DS \times \frac{dC}{dx} \quad \text{- уравнение Фика}$$

$$\frac{dm}{dt} = -PS(C_1 - C_2) \quad \text{- уравнение Каллендера и Берлунда}$$

$$P = iRCT \quad \text{- уравнение Вант-Гоффа}$$

$$\frac{dV}{dt} = \frac{\pi r^4 (P_1 - P_2)}{8l\eta} \quad \text{- уравнение Пуазейля}$$

$$D = \frac{1}{\sqrt{M}} \quad - \text{ уравнение Товерта}$$

$$A = mRT \ln \frac{C_1}{C_2} \quad - \text{ осмотическая работа}$$

$$A = mRT \ln \frac{C_1}{C_2} \pm Fmn (\varphi_1 - \varphi_2) \quad - \text{ общая работа}$$

$$\Delta\mu = \mu_{02} - \mu_{01} + RT \ln \frac{C_2}{C_1} + zF (\varphi_2 - \varphi_1) \quad - \text{ электрохимический градиент}$$

## 5. Биоэлектрические потенциалы

$$E = \frac{U - V}{U + V} \times \frac{RT}{nF} \times \ln \frac{a_1}{a_2} \quad - \text{ уравнение Гендерсона}$$

$$E = \frac{RT}{nF} \times \ln \frac{a_1}{a_2} \quad - \text{ уравнение Нэрнста}$$

$$E = \frac{RT}{nF} \ln \left[ \frac{P_K [K]_i + P_{Na} [Na]_i + P_{Cl} [Cl]_e}{P_K [K]_e + P_{Na} [Na]_e + P_{Cl} [Cl]_i} \right] \quad - \text{ уравнение Гольдмана}$$

$t = kCR$  – время, необходимое для критической деполяризации мембраны;

$\tau = RC$  – постоянная времени мембраны

## 6. Электропроводность биологических объектов

$$I = \frac{U - P_{(t)}}{R} \text{ - закон Ома для биологических объектов}$$

$$P_{(t)} = E_k - E_a = \frac{RT}{nF} \times \ln \frac{a_1}{a_2} \text{ - ЭДС поляризации}$$

$$\epsilon = \frac{E_0}{E} = \frac{C}{C_0} \text{ - диэлектрическая проницаемость}$$

$$C = \frac{\Delta q}{\Delta \varphi}, \quad C = \frac{\epsilon S}{4\pi d} \text{ - емкость}$$

$$C_p = \frac{\int_0^t I dt}{R(I_0 - I_t)} \text{ - поляризационная емкость}$$

$$R_x = \frac{1}{\omega C} \text{ - реактивное сопротивление}$$

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

$$K = \frac{R10^4}{R10^6} \text{ - коэффициент поляризации}$$

## 7. Фотобиологические процессы

$$\ln \frac{I_0}{I} = kCl \text{ - интенсивность светового потока}$$

$$I = I_0 e^{-kCl} \text{ - закон Ламберта-Бера}$$

$D = \epsilon C l$  - оптическая плотность

$\lambda_{\text{люм.}} > \lambda_{\text{погл.}}$  - закон Стокса

$n$

$\varphi = \frac{1}{N}$  - закон Вавилова

$N$

$h\nu$

$E = h\nu = \frac{hc}{\lambda}$  - энергия

$\lambda$

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Биофизика/ Под ред. Антонова В.Ф. – М.- Владос.- 2006
2. Рубин А.Б. Биофизика М.- Изд-во МГУ.- 2004
3. Антонов В.Ф., Черныш А.М., Пасечник В.И. и др Биофизика. Изд.2-е. – М.:Владос.-2003.
4. Артюхов В.Г. Биофизика.-Воронеж.: Изд-во Воронеж.ун-та.-1994.
5. Костюк П.Г. и др. Биофизика.-Киев: Вища школа.- 1988.
6. Волькенштейн М.В. Биофизика.-М.: Наука.-1988.
7. Рубин А.Б. Биофизика в 2 т.- М.: Высшая школа.- 1987.



## ПРОГРАММА КУРСА «БИОФИЗИКА»

Предмет и задачи биофизики. Уровни биофизических исследований – организменный, клеточный, молекулярный. Объекты исследований. Разделы биофизики – биофизика сложных систем, биофизика клетки, молекулярная биофизика. Место и роль биофизики в системе биологических наук. Перспективы развития биофизики. Методы исследования. Основные требования, предъявляемые к биофизическим методам: необходимость соблюдения условия целостности исследуемой системы: требование высокой разрешающей способности. Спектральные, электрические, радиоизотопные, физико-химические, микрохимические методы.

Кибернетический подход к исследованию биологических систем. Основные понятия теории связи и теории информации. Характерные свойства сигналов и сообщений. Вычисление информации, единицы измерения информации. Передача информации. Кодирование наследственной информации. Передача и переработка информации в нервных центрах. Регулирование в системах управления. Значение канала обратной связи, работа аппарата сравнения. Понятие о качестве регулирования. Регулирование на уровне целостного организма, поддержание гомеостаза. Примеры биологических систем регулирования. Понятие функциональной системы.

Термодинамика как наука, изучающая общие закономерности обмена и превращения энергии. Понятие системы в термодинамике. Типы термодинамических систем: закрытые (изолированные и замкнутые) и открытые системы. Термодинамические параметры и функции. Равновесные и неравновесные состояния, обратимые и необратимые процессы. Первый закон термодинамики. Энтальпия. Применение первого закона термодинамики к биологическим системам. Закон Гесса. Калориметрия. Второй закон термодинамики. Свободная и связанная энергия. Понятие энтропии. Роль градиентов. Суперпозиция градиентов. Особенности приложения второго закона термодинамики к биологическим системам. Термодинамическое равновесие и стационарное состояние, их сходство и различия. Основные положения теории открытых систем. Особенности превращения энергии в открытых системах. Диссипативная функция. Основные положения линейной неравновесной термодинамики. Примеры эмпирических законов, устанавливающих связь между потоками и силами. Соотношения взаимности Онзагера. Теорема Пригожина. Устойчивость стационарного состояния. Нелинейная

термодинамика необратимых процессов. Критерии направленности и эволюции термодинамических систем. Условия устойчивости стационарного состояния вдали от равновесия. Диссипативные структуры.

Общая характеристика реакций в биологических системах. Кинетические модели простейших типов реакций. Кинетические свойства элементарных необратимых и обратимых реакций. Влияние температуры на скорость реакции в биологических системах. Энергия активации и активированный комплекс. Кривая Максвелла-Больцмана. Температурный оптимум. Уравнение Аррениуса. Коэффициент Вант-Гоффа. Влияние температуры на соотношение между скоростями отдельных стадий сложных процессов. Определяющие реакции сложного процесса в биологической системе. Выявление лимитирующего звена. Виды биохимических процессов. Кинетика простейших ферментативных реакций. Фермент-субстратный комплекс. Уравнение Михаэлиса – Ментен. Индукция и репрессия синтеза ферментов. Регуляция скоростей биохимических процессов. Принцип Хиншель- Вуда.

Мембрана как универсальный компонент биологических систем. Развитие представлений о структурной организации мембран. Работы Овертона (липидная теория), Даниэли и Давсона (модель «сэндвич»), Робертсона («унитарной мембраны»). Современные представления о строении мембран. Жидкостно-мозаичная модель. Свойства внутриклеточной воды. Свойства белков и липидов. Функции фосфолипидов. Ионные каналы в мембранах. Основные функции биомембран: ограничительная, транспортная, биоэнергетическая, метаболическая, рецепторная, регуляторная.

Методы исследования проницаемости. Способы проникновения веществ через биологические мембраны. Пассивный транспорт веществ. Диффузия. Уравнение диффузии, уравнение проницаемости, константа проницаемости. Транспорт неэлектролитов. Растворимость проникающего вещества в воде и липидах. Значение размеров молекул. Облегченная диффузия. Транспорт веществ с помощью переносчиков. Проницаемость биомембран для ионов. Избирательная проницаемость биологических мембран. Роль заряда, размеров ионов, степени гидратации. Осмос. Осмотическое и онкотическое давление. Электроосмос, аномальный осмос. Осмотические процессы в живых системах. Фильтрация. Примеры фильтрационных процессов в биологических объектах. Активный транспорт веществ. Доказательство существования активного транспорта. Роль переносчиков в механизме активного транспорта.

Энергообеспечение активного транспорта. Примеры активного транспорта ( $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  - насос, Са – насос, I – насос, водородная помпа).

История открытия и изучения биоэлектрических явлений. Внутриклеточное отведение биоэлектрических биопотенциалов. Микроэлектродная техника. Асимметричное распределение ионов как основа возникновения биопотенциалов. Диффузионные, мембранные и фазовые потенциалы. Равновесие Доннана. Уравнение Нернста. Эволюция представлений о механизме возникновения биоэлектрических потенциалов. Мембранная и фазовая теория. Развитие мембранной теории. Современные представления о механизме генерации мембранного потенциала (потенциала покоя). Роль ионов калия. Гипотеза натриевого насоса. Транспортная АТФаза. Значение метаболизма для поддержания потенциала покоя. Потенциал действия. Роль ионов натрия в генерации потенциала действия. Кинетика ионных потоков. Метод фиксации напряжения. Распространение потенциала действия в различных возбудимых образованиях. Метаболические процессы, обеспечивающие восстановление ионных и электрических градиентов.

Пассивные электрические явления. Электрические характеристики биологических тканей и способы их измерения. Прохождение постоянного и переменного тока через биологические ткани. Импеданс: его активная (омическая) и реактивная (емкостная) составляющие. Зависимость электропроводности, емкости и диэлектрической проницаемости от частоты переменного тока. Простейшие эквивалентные схемы биологических объектов. Механизм поляризации в биологических тканях. Виды поляризации. Время релаксации. Особенности структуры клеток и тканей, лежащие в основе их электрических свойств. Зоны дисперсии электрических параметров. Изменения электрических характеристик в зависимости от физиологического состояния объекта. Коэффициент поляризации. Методы измерения электропроводности.

Основы механизма поглощения и излучения квантов света молекулами. Поперечное сечение фотопроцесса, квантовый выход. Электромагнитный спектр. Сопоставление длины волны, частоты колебаний и энергии электромагнитных излучений. Электромагнитные излучения как инструмент биофизических исследований структуры и свойств молекул. Общая характеристика биологического действия различных участков электромагнитного спектра. Механизм элементарных фотопроцессов (фотовосстановление, фотоокисление, фотоизомеризация, фоторазложение). Общие свойства механизма фотобиологических процессов: возбуждение

фоторецептора, миграция энергии, первичный фотохимический акт, сопряжение с энзиматическими состояниями, физиологический эффект. Механизмы и способы выявления миграции энергии. Основные фотобиологические процессы в живых системах: фотосинтез, фототаксис, фототропизмы, фотоморфогенез, зрительный процесс, фотореактивация, фотодинамическое действие.

Виды ионизирующей радиации: электромагнитное и корпускулярное. Взаимодействие ионизирующего излучения с веществом. Образование свободных радикалов. Физический эквивалент рентгена. Биологический эквивалент рентгена. Относительная биологическая эффективность. Действие ионизирующего излучения на биологические объекты. Этапы воздействия ионизирующего излучения на биологические объекты: стадия поглощения энергии, специфическая реакция организма. Особенности процесса лучевого поражения. Влияние физических факторов. Теории, объясняющие механизмы лучевого поражения: теория мишени, теория непрямого действия, теория прямого действия, теория высвобождения ферментов. Теория цепных процессов.

#### ОСНОВНАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Биофизика/ Под ред. Антонова В.Ф. – М.- Владос.- 2006
2. Рубин А.Б. Биофизика М.- Изд-во МГУ.- 2004
3. Антонов В.Ф., Черныш А.М., Пасечник В.И. и др Биофизика. Изд.2-е. – М.:Владос.-2003.
4. Артюхов В.Г. Биофизика.-Воронеж.: Изд-во Воронеж.ун-та.-1994.
5. Костюк П.Г. и др. Биофизика.-Киев: Вища школа.- 1988.
6. Волькенштейн М.В. Биофизика.-М.: Наука.-1988.
7. Рубин А.Б. Биофизика в 2 т.- М.: Высшая школа.- 1987.

#### ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Кольс О.Р. Биофизика ритмического возбуждения.- М.: Изд-во МГУ.- 1993.
2. Никольсон П. Биоэнергетика.-М.: Наука.-1984.
3. Рубин А.Б. Термодинамика биологических процессов.-М.:Наука.-1984.
4. Ремизов А.Н. Медицинская и биологическая физика.- М.: Высшая школа.-1987.

5. Губанов Н.И., Утенбергеров А.А. Медицинская биофизика.- М.:Медицина.-1978.

6. Биофизика / Под ред. Тарусова Б.Н. и Кольс О.Р.- М.: Высшая школа.- 1968.

#### ИНТЕРНЕТ-РЕСУРСЫ:

[library.biophys.msu.ru/rubin/](http://library.biophys.msu.ru/rubin/)

[all-fizika.com/article/index.php?id..](http://all-fizika.com/article/index.php?id..)

[6years.net/index.php?do=static&page...](http://6years.net/index.php?do=static&page...)