

ФГБОУ ВО НГАУ
БИОЛОГО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

БИОФИЗИКА
методические указания по выполнению лабораторных работ

НОВОСИБИРСК 2022

УДК 577.3 (07)

Кафедра физиологии и биохимии человека и животных

Составители: д-р вет. наук, проф. *П.Н. Смирнов*
канд. биол. наук, доц. *Н.В. Ефанова*
канд. биол. наук, доц. *Л.М. Осина*
канд. биол. наук, доц. *С.В. Баталова*

Рецензент: доц. кафедры теоретической и прикладной физики
Дзю И.М.

Биофизика: методические указания, изд.-е 2; исп. /
Новосиб. гос.-аграр. ун-т, Биол.-технол. фак.; сост.:
П.Н. Смирнов, Н.В. Ефанова, Л.М. Осина, С.В.
Баталова. – Новосибирск: ИЦ «Золотой колос», 2022. –
39 с.

Данные методические указания предназначены для изучения дисциплины «Биофизика» и представлены комплексом лабораторных работ, позволяющих студентам приобретать навыки в проведении экспериментов и развивать аналитические способности при обработке полученных результатов. Каждое задание подкреплено контрольными вопросами, способствующими лучшему усвоению изучаемого материала.

Методические указания построены в соответствии с программой курса для студентов очного отделения по направлению подготовки 06.03.01 Биология.

Утверждены и рекомендованы к изданию учебно-методической комиссией БТФ (протокол № 7 от 29.09 2022 г.)

© Новосибирский государственный аграрный университет, 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ТЕМА 1. ФИЗИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЭЛЕКТРОКАРДИОГРАФИИ (ЭКГ)	7
ТЕМА № 2. БИОМЕХАНИКА МЫШЕЧНОГО СОКРАЩЕНИЯ	13
ТЕМА № 3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОВЕРХНОСТНОГО НАТЯЖЕНИЯ ЖИДКОСТИ	20
ТЕМА № 4. ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРНЫХ СВОЙСТВ ЭРИТРОЦИТОВ МЕТОДОМ РЕГИСТРАЦИИ КИСЛОТНЫХ И ОСМОТИЧЕСКИХ ЭРИТРОГРАММ	23
ТЕМА № 5. КИНЕТИКА ХИМИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ. ИНГИБИРОВАНИЕ. ЗАВИСИМОСТЬ СКОРОСТИ РЕАКЦИИ ОТ ТЕМПЕРАТУРЫ	31
БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК	38

ВВЕДЕНИЕ

Дисциплина «Биофизика» должна содержать: термодинамику биологических процессов, кинетику биологических процессов, пути преобразования энергии в клетке, фотобиологические процессы, молекулярную биофизику, биофизику биологических мембран, проницаемость клеток и тканей, биоэлектрические явления, биофизику сократительных систем.

Дисциплина относится к вариативной части Б. 1. обязательных дисциплин.

В соответствии с ФГОС ВО в результате изучения дисциплины обучающиеся должны:

знать:

- физические основы жизнедеятельности, включая химическое строение и свойства природных соединений и их комплексов;

- основные закономерности протекания биологических процессов с точки зрения термодинамики, механизмы их регуляции, биофизические механизмы реализации генетической информации;

- теоретическую и практическую значимость биофизики, взаимосвязь с другими естественными науками;

- новейшие достижения в области биофизики и перспективы их использования в различных областях народного хозяйства, медицины.

уметь:

- использовать знания биофизики для объяснения важнейших физиологических процессов, протекающих в живых организмах, как в норме, так и при возникновении патологии;

- использовать биофизические методы исследований в экспериментальной биологии.

владеть:

- комплексом лабораторных и полевых методов исследований;

- основными методами защиты производственного персонала и населения от возможных последствий аварий, катастроф, стихийных бедствий.

Целью учебной дисциплины «Биофизика» является формирование у студентов представление о важнейших физических процессах, протекающих в живых организмах, основных принципах и теоретических положениях биофизики. Объяснить взаимосвязь физического и биологического аспектов функционирования живых систем.

В процессе освоения дисциплины используются следующие образовательные технологии, способы и методы формирования компетенций: проблемная лекция-презентация, семинары в диалоговом режиме, групповые дискуссии, подготовка письменных аналитических работ, текущая самостоятельная работа по выполнению разных видов заданий, деловая учебно-исследовательская игра.

Контроль знаний, умений и навыков студентов осуществляется в следующих формах: в течение года в

соответствии с рабочим учебным планом выполняется 1 контрольная работа на очном отделении, для оценки уровня освоения материала по дидактическим единицам проводятся: коллоквиумы, контрольные работы, самостоятельное выполнение студентами домашних заданий с отчетом, тестирование по материалам дисциплины.

Промежуточная форма отчетности – зачет.

ТЕМА 1. ФИЗИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЭЛЕКТРОКАРДИОГРАФИИ (ЭКГ)

Теоретическая часть

Сердце можно условно представить как генератор, имеющий ЭДС ε и достаточно высокое внутреннее сопротивление r , превышающее сопротивление нагрузки.

Силу тока генератора можно найти по формуле $I = \frac{\varepsilon}{r+R}$.

Найдем потенциал электрического поля генератора. Принимается, что генератор представляет диполь с дипольным моментом $D=Il$, где l – расстояние между противоположными зарядами диполя. При $l \rightarrow 0$ диполь становится точечным.

Рассмотрим электрическое поле униполя (создается одним зарядом).

Плотность электрического поля $j = \frac{I}{S} = \frac{I}{\pi r^2}$; $j = \frac{d\varphi}{\rho dr}$, где $d\varphi$ – потенциал электрического поля, dr – расстояние от униполя, ρ – удельное сопротивление среды.

$$\frac{I}{\pi r^2} = -\frac{d\varphi}{\rho dr}, \quad d\varphi = -\frac{\rho dr}{4\pi r^2}$$

Для положительного униполя получаем: $\varphi_a = \int d\varphi = - \int \frac{\rho dr}{4\pi r^2} = \frac{\rho}{4\pi r}$

Для отрицательного униполя получаем: $\varphi_a = - \frac{\rho}{4\pi r}$

Наконец, для целого диполя: $\varphi_a = \frac{\rho}{4\pi r_1} - \frac{\rho}{4\pi r} = \frac{\rho(r_1 - r)}{4\pi r r_1}$

Рассмотрим, чему равно электрическое поле в точке А, расположенной на некотором расстоянии от данного диполя (рис. 1).

Из рисунка видно, что если $l \ll r$, то $r_1 \sim r^2$, $r - r_1 \sim l \cos \theta$, где θ – угол между дипольным моментом D и направлением от диполя к точке А. Таким образом получаем:

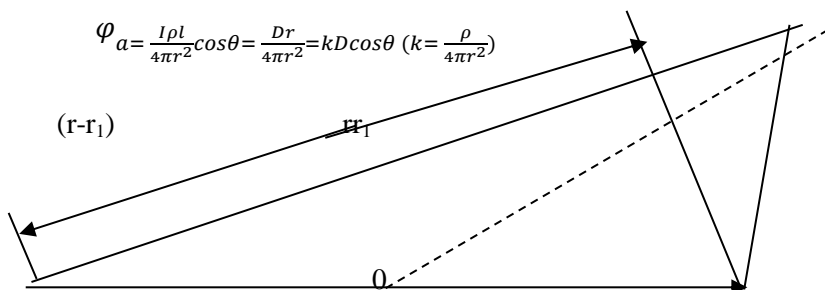


Рис. 1. Электрическое поле в точке

Найдем разность потенциалов между точками А и В, расположенными на одинаковом расстоянии от диполя (рис. 2).

$$\Delta\varphi = kD\cos\theta_A - kD\cos\theta_B = kD (\cos\theta_A - \cos\theta_B)$$

$\Delta\varphi = 2k\sin\beta\cos\alpha$; если $K = \frac{\rho\sin\beta}{2\pi r^2}$, $\Delta\varphi = KD\cos\alpha = kD_{AB}$, где D_{AB} – проекция вектора D на ось, соединяющую А и В.

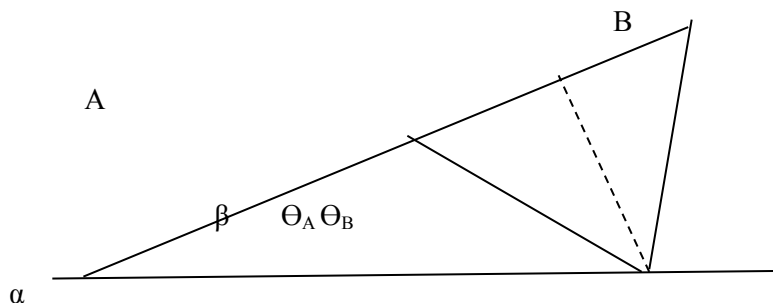


Рис. 2. Разность потенциалов между двумя точками

Из последних формул очевидно, что разность потенциалов между двумя точками, удаленными от диполя, будет тем больше, чем больше удельное сопротивление среды, меньше расстояние до диполя и больше расстояние между этими точками. Очевидно также, что потенциал двух точек диполя точечного электрического диполя примерно

равен проекции дипольного момента на прямую, соединяющую точки, следовательно, измеряя разность потенциалов на поверхности тела, мы определяем проекции дипольного момента, а значит, потенциал сердца. Эти выкладки легли в основу модели Эйнтховена.

Основные постулаты модели

1. Электрическое поле сердца рассматривается как электрическое поле точечного диполя с дипольным моментом D (интегральный электрический вектор сердца). Этот дипольный момент складывается из дипольных моментов различных частей сердца, т.е. $D = \sum D_i$.

2. Проводящая среда организма изотропна, удельное сопротивление среды принимается одним и тем же в любой точке внутри организма.

3. Интегральный электрический вектор сердца E меняется по амплитуде и направлению. Его начало неподвижно и находится в атрио-вентрикулярном узле, а конец описывает сложную пространственную фигуру, проекция которой на фронтальную плоскость образует за цикл три петли: P, QRS, T.

Практическая часть

Цель работы: определить зависимость различных параметров ЭГ сердца лягушки от расстояния между электродами и сердцем.

Задачи

- Зарегистрировать ЭКГ и ЭГ изолированного сердца лягушки
- Определить связь зубцов ЭГ и ЭКГ с активностью разных отделов сердца
- Зарегистрировать ЭКГ при разном расстоянии между электродами и сердцем и при различных воздействиях на сердце

- Выявить зависимость между расстоянием от сердца до электрода и величиной зубцов ЭКГ

Материалы и оборудование. Нож, скальпель, лигатура, раствор Рингера, некротизированная мышечная ткань лягушки, электрокардиограф, фильтровальная бумага, фитильковые электроды.

Порядок работы. Лягушку обездвигить разрушением спинного и головного мозга и закрепить в восковой ванночке брюшной стороной вверх. Вскрыть грудно-брюшную полость, для чего сделать продольный разрез на расстоянии 1 – 2 мм от средней линии живота, на уровне плечевого пояса разрезать кожу в поперечном направлении, приподнять пинцетом мечевидный отросток грудины и рассечь ножницами находящиеся под ним мышечные слои. Перерезать кость плечевого пояса по средней линии. Затем сделать небольшой продольный разрез мышечной стенки живота и зафиксировать с помощью булавок рассеченные ткани. Удалить соединительную ткань между сердцем и печенью. Приподнять сердце таким образом, чтобы были видны полые вены. Нижнюю полую вену освободить от перикарда, перевязать и отсечь ниже места перевязки. Отсечь остальные ткани и сосуды.

Сердце положить на фильтровальную бумагу, смоченную раствором Рингера. Закрепить электроды на фильтровальной бумаге, как показано на рис. 3.

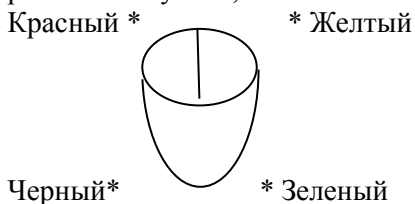


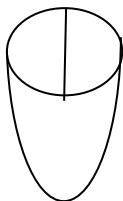
Рис. 3. Расположение электродов при регистрации ЭКГ изолированного сердца лягушки

Включить прибор в сеть и дать ему прогреться в течение 10 – 15 мин. Записать калибровочное значение

потенциала 1 мВ. Зарегистрировать ЭКГ, для чего переключатель отведений поставить в положение 1 и нажать кнопку «запись». Длительность записи вести из расчета 4 – 5 циклов для отчета каждого участника эксперимента. Измерения провести при расположении электродов на расстоянии 0.5, 1, 2, 3 см от сердца.

Красный*

* Желтый



Черный* Зеленый *

Рис. 4. Порядок расположения электродов при регистрации ЭКГ

На боковую поверхность желудочка положить некротизированную ткань (кусочек омертвевшей мышцы) и зарегистрировать изменения ЭКГ. Снять некротизированную ткань и зарегистрировать ЭКГ. Повторить эксперимент при наложении некротизированной мышцы на вентральную поверхность желудочка.

Для регистрации ЭКГ поместить электроды на поверхность сердца в соответствии с рис. 4.

Зарегистрировать ЭКГ при том же режиме работы электрокардиографа. Сделать вывод о том, как изменяются параметры ЭКГ при приближении электродов к поверхности сердца. Построить график зависимости $\varphi_R = f(l)$, где φ_R – величина зубца R, l – расстояние.

Снять ЭКГ после наложения некротизированной ткани на боковую поверхность желудочка. Зарегистрировать изменения и восстановление ЭГ.

По атриовентрикулярной границе желудочка подвести лигатуру, не затягивая ее. Записать ЭКГ до и после перевязывания лигатуры и остановки желудочка. Отсечь желудочек и записать ЭКГ предсердий.

Разместить один из отводящих электродов на границу венозного синуса. Записать ЭКГ до и после наложения лигатуры на границу между правым предсердием и венозным синусом. (1-ая лигатура Станниуса). Отсечь предсердия по сино-атриальной границе и перенести оба электрода на синус. Зарегистрировать ЭКГ венозного синуса.

Перенести оба электрода на поверхность изолированного желудочка и зарегистрировать ЭКГ. Механическим раздражением стимулировать в изолированном желудочке возникновение атриовентрикулярного ритма.

Проанализировать и описать все полученные результаты. Обратить внимание на нелинейную зависимость $\varphi_R = f(l)$, сделать вывод о причинах такой зависимости.

Контрольные вопросы.

1. Строение сердца, автоматия, особенности потенциалов пейсмекеров и кардиомиоцитов.
2. Основные положения теории ЭКГ Эйнтховена.
3. Разность потенциалов, создаваемая униполюсом.
4. Разность потенциалов в точке, создаваемая диполем.
5. Разность потенциалов между двумя точками, создаваемая точечным диполем.

ТЕМА 2. БИОМЕХАНИКА МЫШЕЧНОГО СОКРАЩЕНИЯ

Теоретическая часть

Волокно скелетной мышцы представляет многоядерную клетку толщиной около 0.05 – 1 мм и длиной от нескольких миллиметров до нескольких сантиметров. Функциональной единицей мышцы является саркомер – пространство мышечного волокна, ограниченное двумя Z – пластинками.

Биомеханика мышцы определяется действием в ней нескольких типов сил:

- упругость
- вязкость (внутреннее трение среды)
- вязкоупругость
- деформация, которая определяется как $\varepsilon = \frac{\Delta l}{l}$, где Δl – изменение длины мышцы, l начальная длина;
- механическое напряжение δ – мера внутренних сил, возникающих при деформации,

$\delta = \frac{F}{S}$, F – сила, приложенная к стержню, S – площадь поперечного сечения стержня.

По закону Гука механическое напряжение, возникающее в результате действия сил упругости, равно $\delta_{\text{упр}} = \varepsilon E$, где E – модуль Юнга. Из-за вязкости возникает $\delta_{\text{вязк}} = \eta \frac{d\varepsilon}{dt}$, где η – коэффициент вязкости.

Общее механическое напряжение будет определяться суммой сил упругости и вязкости, следовательно $\delta = \delta_{\text{упр}} + \delta_{\text{вязк}} = \varepsilon E + \eta \frac{d\varepsilon}{dt}$, следовательно $\eta \frac{d\varepsilon}{dt} = \delta - \varepsilon E$.

После решения уравнения получаем: $\varepsilon + \frac{\delta}{E} = e^{\frac{-t}{\tau}}$, где $\tau = \frac{\eta}{E}$ – время запаздывания.

Таким образом $\varepsilon = \frac{\eta \frac{d\varepsilon}{dt} \delta}{E}$, следовательно, деформация увеличивается с убывающей скоростью,

$$\lim_{\frac{d\varepsilon}{dt} \rightarrow 0} \varepsilon = \frac{\delta}{E}$$

Эквивалентная схема мышцы представлена на рис. 5.

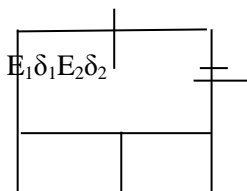


Рис. 5. Компоненты мышечного волокна.

Условно выделяют компонент E_1 , который зависит от механических свойств внешней мембраны, Т-системы, саркоплазматического ретикулума и компонент E_2 , характеризующийся через упругость актин-миозинового комплекса, обусловленного местами прикрепления актина к Z – дискам и местами соединения актин-миозиновых мостиков.

Сокращения мышцы принято делить на два основных типа: изометрическое (при неизменной исходной длине мышцы) и изотоническое (при постоянной массе поднимаемого мышцей груза).

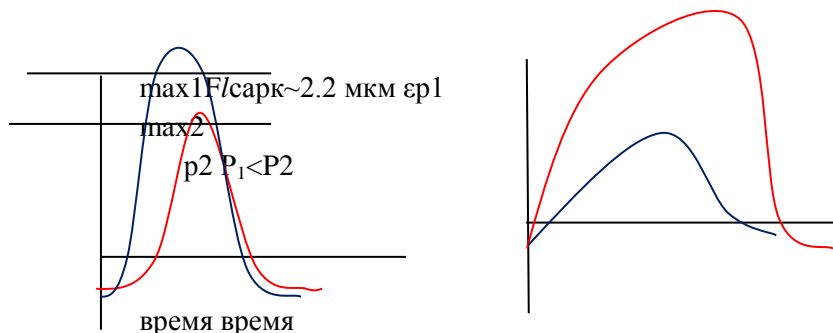


Рис. 6. Зависимость скорости сокращения от нагрузки.

График слева показывает зависимость силы, развиваемой мышцей при ее изометрическом сокращении, от исходной длины растянутого саркомера. Максимальное сокращение наблюдается при длине саркомера ~ 2.2 мкм, т.к. именно при этой длине площадь контакта между актином и миозином максимальна. Справа показана зависимость $e(t)$ при изотоническом режиме сокращения. Здесь P_1 – и P_2 – вес поднимаемого мышцей груза, причем $P_1 < P_2$. Из последнего типа зависимости непосредственно вытекает закон Хилла, согласно которому скорость сокращения мышцы будет тем больше, чем меньше нагрузка на мышцу. Математически закон выражается в виде уравнения Хилла:

$$V(m) = \frac{b(m_0 - m)}{m + a}, \text{ где } m_0 - \text{максимальный груз,}$$

удерживаемый мышцей без ее сокращения, т.е. максимальное изометрическое напряжение, b – коэффициент, имеющий размерность скорости, a – коэффициент с размерностью силы. Таким образом, скорость сокращения будет максимальна при $m_0 = 0$.

Работа мышцы вычисляется по формуле $w = m dl = m V dt$

Мощность, развиваемая мышцей,
 $N = \frac{dw}{dt} = mV = m \frac{b(m_0 - m)}{m + a}$. Оптимальная масса, при которой
 мощность, развиваемая мышцей, максимальна, вычисляется
 по формуле $m_{\text{опт}} = \sqrt{a(m_0 + a)} - a$. При $m_{\text{опт}} N_{\text{max}}$
 ($m = 0.31m_0$). Графически зависимости отражены на рис. 7.

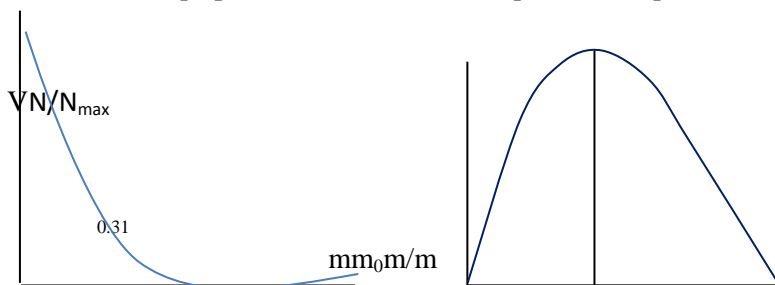


Рис. 7. Графики зависимости Хилла (слева) и зависимости мощности мышцы от m .

Эффективность работы при сокращении мышцы можно определить как $\frac{N}{dG}$, где dG – энергия, затраченная мышцей на сокращение.

Для объяснения природы коэффициентов a и b в уравнении Хилла Дещеревский предложил модель, согласно которой возможны три взаимопереходных состояния актин-миозиновых мостиков: 1) Разомкнутый мостик – контакт между актином и миозином отсутствует; 2) Тянувший мостик, в котором головка миозина контактирует с актиновой фибриллой и развивает тянущую силу. Скорость перехода из первого состояния во второе характеризуется константой скорости k_1 (константа замыкания свободного мостика); 3) Тормозящий мостик: в этом состоянии пройдена координата точки прикрепления миозиновой головки к актиновому волокну. Константа скорости перехода к этому состоянию из состояния тянущего мостика равна $\frac{U}{\delta}$, где U – скорость

скольжения нитей друг относительно друга, δ – длин зоны, в которой мостик развивает тянущую силу. 4) Наконец, тормозящий мостик вновь переходит в разомкнутое состояние с константой k_2 (константа скорости распада тормозящих мостиков).

Основываясь на данной модели, Дещеревский вывел следующие формулы для коэффициентов a и b в уравнении Хилла:

$$a = \frac{k_1}{k_1 + k_2} m_0; b = \frac{k_1 k_2 \delta}{k_1 + k_2}$$

Практическая часть. Исследование параметров сокращения портняжной мышцы лягушки

Цель работы: Определить основные параметры мышечного сокращения

Задачи:

- Исследовать собственную возбудимость мышц
- Исследовать непрямую возбудимость мышц
- Сделать графическую запись различных форм тетануса
- Определить абсолютную силу мышц
- Выявить локализацию утомления в мышце

Материалы и оборудование: лягушка, стимулятор, вертикальный миограф, стимулирующие электроды, кимограф, универсальный штатив, хирургические инструменты, раствор Рингера, нитки, груз разной массы, хрооформ, ваночки с воском.

Ход работы. Слабо наркотизированную лягушку обездвигить (разрушить длинной иглой головной и спинной мозг, приколоть к ванночке с воском спиной вверх). Снять кожу с бедра, раздвинуть мышцы, найти в глубине бедренную артерию и седалищный нерв и отпрепарировать его. Сделать продольный разрез кожи голени, обнажить икроножную мышцу и подвести к ней электроды.

Выполнить раздражение мышцы прерывистым током и отметить сокращение мышцы. Это прямой способ раздражения, а отмеченный сократительный эффект доказывает существование собственной возбудимости мышц.

Положить на электроды конец отпрепарированного нерва и включить стимулятор. Отметить сокращение мышц при непрямом раздражении. Продолжать раздражение через нерв до полного утомления мышцы (т.е. до прекращения ее сокращений). После этого провести прямое раздражение мышцы. Отметить, что она вновь способна сокращаться. Сделать вывод о локализации утомления в нервно-мышечном препарате.

Приготовить нервно-мышечный препарат, состоящий из седалищного нерва и икроножной мышцы. Для этого перерезать лягушке с разрушенным спинным и головным мозгом позвоночник, отступив от копчиковой кости 1 – 1.5 см и отделить всю свисающую часть туловища и большую часть внутренностей. Снять кожу с обеих лапок, удалить копчиковую кость. Очистить препарат от остатков внутренностей и разрезать тазовую кость около позвонков и оставшиеся позвонки. Отпрепарировать нерв до тазобедренного сочленения и затем до коленного сустава (для этого нужно перевернуть лапку и расщепить фасции между полуперепончатой и двуглавой мышцами бедра). Изолировать икроножную мышцу, отделить ахиллово сухожилие и перерезать голень ниже колена. Укрепить нервно-мышечный препарат в вертикальном миографе, конец, к которому подходит нерв, должен быть обращен вверх. Поместите нерв на стимулирующие электроды, прикрыв его до начала опытов ватой, смоченной в растворе Рингера. Подавая на нерв одиночные стимулы с фиксированной длительностью и постепенно увеличивая

амплитуду, найдите величину порогового стимула. Запишите мышечные сокращения при разной частоте стимуляции. Найдите частоту, при которой появляется зубчатый и гладкий тетанус.

Для нахождения абсолютной силы под мышцу, закрепленную за ахиллово сухожилие, необходимо подвести подпорку, которая будет препятствовать растяжению мышцы после подвешивания к ней груза и позволит лишь поднимать груз при сокращении. Подобрать силу и частоту раздражения, при которых получается максимальная амплитуда сокращения мышцы. Записать максимальную амплитуду сокращения неотягощенной мышцы. Затем записать амплитуду сокращения мышцы после прикрепления к ней груза массой 20 г и увеличивать постепенно нагрузку на 5 г, не меняя параметров стимуляции. Найти предельный вес груза, который мышца может поднять. Выраженная в граммах, эта величина будет соответствовать абсолютной силе данной мышцы.

Контрольные вопросы.

1. Силы, определяющие биомеханику мышцы
2. Общее механическое напряжение мышцы
3. Зависимость силы мышечного сокращения от длины саркомера
4. Зависимость скорости мышечного сокращения от нагрузки
5. Работа, мощность и эффективность работы мышцы
5. Коэффициенты a и b в уравнении Хилла. Модель Дещеревского.

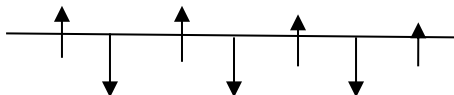
ТЕМА 3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОВЕРХНОСТНОГО НАТЯЖЕНИЯ ЖИДКОСТИ

Цель: Освоить способ определения поверхностного натяжения жидкости методом отрыва каплей. Оценить поверхностное натяжение различных жидкостей. Оценить поверхностное натяжение крови в норме и в присутствии желчных кислот.

Теоретическая часть

Молекула, находящаяся внутри жидкости, взаимодействует с окружающими ее молекулами. Так как взаимодействия симметричны, то равнодействующая равна нулю. Для молекулы, находящейся вблизи поверхности, симметрия нарушается и возникает сила, не скомпенсированная действием других молекул и направленная внутрь жидкости. Поэтому для перемещения молекул из толщи жидкости к поверхности необходимо совершить работу.

При отсутствии внешних сил молекулы жидкости стремятся занять положение, соответствующее минимуму потенциальной энергии, поэтому жидкость в свободном состоянии стремится иметь минимальную площадь поверхности и принимает форму шара. Поверхностный слой уплотняется, что похоже на упругую пленку, в которой действуют упругие силы (силы поверхностного натяжения), направленные по касательной к поверхности. Если условно выбрать на поверхности жидкости отрезок длиной l , то силы поверхностного натяжения F можно изобразить стрелками, перпендикулярными отрезку. Поверхностное натяжение равно $\sigma = F/l$



Так как молекулы поверхностного слоя обладают большей потенциальной энергией по сравнению с молекулами, находящимися внутри жидкости, то для увеличения площади поверхности жидкости необходимо совершить работу против сил поверхностного натяжения. Тогда $\sigma = A/S$

Поверхностное натяжение биологических жидкостей в некоторых случаях может служить диагностическим фактором. Так, например, при заболевании желтухой поверхностное натяжение мочи резко уменьшается вследствие появления в моче желчных кислот. При диабете и некоторых других заболеваниях повышается содержание липазы в крови. О содержании липазы судят по изменению поверхностного натяжения раствора трибутилена при добавлении в него крови.

Для определения поверхностного натяжения в мед.практике пользуются методом отрыва капль. При медленном истечении жидкости из отверстия или из вертикальной трубки образуется капля. Отрыв происходит по шейке капли или перетяжке, радиус которой меньше радиуса отверстия. Предполагается, что в момент отрыва сила поверхностного натяжения $F = 2\pi r\sigma$ равна силе тяжести $p = \rho g V$ (R – радиус шейки капли, ρ – плотность жидкости, V – объем капли), т.е. $2\pi R\sigma = \rho Vg$, откуда $\sigma = \frac{\rho Vg}{2\pi R}$ (*)

Измерить радиус шейки капли практически нельзя (это можно сделать только при фотографировании капли в момент отрыва), поэтому в данном методе прибегают к сравнительному способу.

Если известно поверхностное натяжение стандартной жидкости, например, воды, то:

$$\sigma_0 = \frac{\rho_0 V_0 g}{2\pi R} \quad (**)$$

Взяв одинаковые объемы V_1 воды и исследуемой жидкости и подсчитав количество капель в этих объемах, можно вычислить объем одной капли:

$$V_o = V_1/n_o \text{ (воды)}, V = V_1/n \text{ (исследуемой жидкости)}$$

Подставив эти выражения в уравнения * и ** и взяв их отношение, получим:

$$\frac{\sigma}{\sigma_o} = \frac{pn_o}{p_o n} \quad \text{или} \quad \sigma = \frac{\sigma_o p n_o}{p_o n}$$

Порядок выполнения работы

1. Промойте капельницу, закрепите ее вертикально в штативе и залейте в нее определенный объем дистиллированной воды.

2. Открыв кран, подсчитайте количество капель в данном объеме n_o

3. Опыт повторите 3 раза, найдите среднее значение n_o

4. Аналогичные эксперименты (также при повторении по 3 раза) проведите:

А) с ацетоном

Б) со смесью ацетона и воды в соотношении 1:1

В) со смесью ацетона и воды в соотношении 3:1

Г) со смесью ацетона и воды в соотношении 1:3

Д) с 0.9% раствором NaCl

Е) с 0.9% раствором Na_2SO_4

5. Вычислите поверхностное натяжение указанных жидкостей. Постройте график зависимости поверхностного натяжения от степени разбавления ацетона водой. Сделайте выводы по полученным результатам, объясните их.

6. Измерьте поверхностное натяжение крови (возьмите 1 мл) и крови, в которую была добавлена желчь. Сделайте выводы о механизмах изменения поверхностного натяжения крови под влиянием желчи.

Контрольные вопросы

1. В чем заключается явление поверхностного натяжения.
2. Что такое сила поверхностного натяжения и как она измеряется.
3. Что такое поверхностно-активные вещества.
4. В чем заключается измерение поверхностного натяжения методом отрыва капель.
5. Какое значение имеет поверхностное натяжение для медицины.
6. Как поверхностное натяжение зависит от температуры.
7. Как поверхностное натяжение зависит от концентрации раствора.

ТЕМА 4. ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРНЫХ СВОЙСТВ ЭРИТРОЦИТОВ МЕТОДОМ РЕГИСТРАЦИИ КИСЛОТНЫХ И ОСМОТИЧЕСКИХ ЭРИТРОГРАММ

Цель: измерить осмотическую и кислотную резистентность эритроцитов

Теоретическая часть

Безъядерные эритроциты млекопитающих отличаются высокой однородностью электронно-оптической плотности цитоплазмы, что позволяет использовать их в качестве модели при исследовании клеточных и молекулярных механизмов действия различных физико-химических факторов на структурно-функциональные свойства биологических систем. Эритроцит представляет двояковогнутый диск диаметром 6-9 мкм и толщиной в центре – 1 мкм, по краю – 2-2.5 мкм. Объем эритроцита – 90 мкм³, площадь поверхности – 142 мкм². Толщина

эритроцитарной мембраны - 6 нм, она содержит 50% белка, 43% липидов, 7% углеводов.

Липидный состав мембраны эритроцита: 25% - холестерол, 60% - фосфоглицериды, 5-10% - гликолипиды и незначительное количество эфиров холестерола, свободных жирных кислот, сульфатов и триглицеридов. В составе фосфолипидов 17% - сфингомиелин, 25% - фосфатидилхолин, 22% - фосфатидилэтаноламин и ~ 10% - фосфатидилсерин. Среди жирных кислот преобладают пальмитиновая, олеиновая, линолевая и линоленовая.

Белковый состав мембраны характеризуется строго упорядоченной структурой, белковые молекулы занимают определенное положение относительно липидного бислоя и в большинстве имеют ориентацию, перпендикулярную бислою. Белковый каркас состоит в основном из спектрин-актинового комплекса, связанного с мембраной через белок полосы 3 (б.п.3) и гликофорин посредством анкирина и б.п.4.1. Б.п.3 содержит на N-конце кислый участок, связанный с некоторыми гликолитическими ферментами и молекулой гемоглобина. Спектрин-актиновая сеть образует треугольные ячейки под поверхностью мембраны, стабилизируя ее и ограничивая латеральную подвижность мембранных белков.

Механизмы гемолиза эритроцитов

При осмотическом гемолизе эритроцит разрушается за счет разности осмотического давления во внеклеточной и внутриклеточной средах. Для гемолиза эритроциты помещают в анизотоничную (например, гипотоничную) среду. В результате вода поступает внутрь клеток, их форма меняется при неизменном радиусе, т.е. дискоцит превращается в сфероцит и при достижении сфероцитом критического объема (146% объема дискоцита)

наступает стадия гемолиза – выход свободного гемоглобина и его фрагментов в окружающую среду. Для выхода гемоглобина необходимо наличие в мембране эритроцитов дефектов радиусом около 3.25 нм.

При индуцированном гемолизе разрушение эритроцитов происходит из-за действия определенных химических веществ на эритроцитарную мембрану (кислот, щелочей, кетонов, спиртов и проч.). Эффект действия многих из них складывается из нескольких этапов:

1) Взаимодействие гемолитического агента с мембраной. Если мембрана проницаема для гемолитика, он проникает в ее толщу, если же нет – разрушает мембрану с поверхности.

2) Индуцирование гемолитиком структурных нарушений в упорядоченной цитоплазматической структуре эритроцита, диссоциация молекул гемоглобина, сопровождающаяся повышением онкотического давления.

3) При достижении критического объема образуются дефекты в мембране эритроцита, что сопровождается выходом молекул гемоглобина наружу.

Стадии гемолиза:

1) Предгемолитическая. Идет выход K^+ в окружающую среду и сферуляция эритроцитов.

2) Стадия гемоглобинолиза. Она протекает по разному в зависимости от свойств гемолитика. Например, может происходить выход связанного гемоглобина из-за распада гемоглобистромального комплекса в цитоплазме эритроцита. Происходит нарушение физико-химических свойств эритроцитарных клеток.

3) Строматопороз. Эта стадия наступает, например, при действии на эритроцит сапонинов

4) Строматолиз, т.е. полная деградация клеточных структур, наблюдаемая при действии холево-, дезоксихолево-, олеиновокислого натрия и других гемолитиков.

Гемолитическое действие сильных кислот и оснований обусловлено взаимодействием H^+ и OH^- с мембраной эритроцита, из-за чего в ней образуются дефекты – потры, через которые эти ионы проникают внутрь эритроцита, снижая общий заряд гемоглобина и др. белков и приводя к их диссоциации, следовательно, повышению онкотического давления. Эритроцит сферулируется и при достижении критического объема гемолизируется. Есть данные (Иванов, Бенев, 1986), что основную роль в кислотном гемолизе эритроцитов играет агрегация мембранных белков под влиянием гемолитика. В частности, тиоцианат, препятствующий агрегации, предотвращает и кислотный гемолиз.

При анализе гемолиза эритроцита следует учитывать возможность сильных отличий непосредственного эритроцитарного микроокружения от среды. В создании таких различий большую роль может играть дзета-потенциал. Рассмотрим вопрос подробнее.

Поверхность большинства мембран отрицательно заряжена благодаря присутствию кислых фосфолипидов и белков. Естественно, заряд должен нейтрализоваться противоионами из окружающей среды, которые, однако, подвижны, не закреплены жестко на поверхности мембраны. Их концентрация меняется в объеме водной фазы таким образом, что устанавливается определенный баланс между стремлением ионов к равномерному распределению в объеме водной фазы вследствие энтропийного фактора и электростатическим притяжением к поверхностным зарядам. В результате

противоионы локализуются на некотором расстоянии от мембраны, создавая т.о. двойной диффузионный слой (поверхность мембраны с фиксированными зарядами и диффузное облако противоионов вблизи нее). Электрический потенциал в околосмембранном растворе является функцией поверхностной плотности заряда, концентрации и валентности ионов в растворе. Теория поверхностного потенциала была разработана в начале XX в. Гюи и Чапменом и дополнена позднее Штерном. В ее основе лежат 4 предположения:

1) Заряды равномерно расположены на поверхности мембраны.

2) Ионы раствора являются простыми точечными зарядами пренебрежительно малых размеров,

3) Эффекты притяжения подвижных ионов при приближении к поверхности диэлектрика считают пренебрежимо малыми,

4) Диэлектрическая проницаемость водной фазы считают величиной постоянной, одинаковой на поверхности мембраны и в водной фазе.

На рис. 8 показана зависимость поверхностного потенциала Ψ от поверхностной плотности отрицательного заряда (график слева) и от ионной силы раствора (график справа).

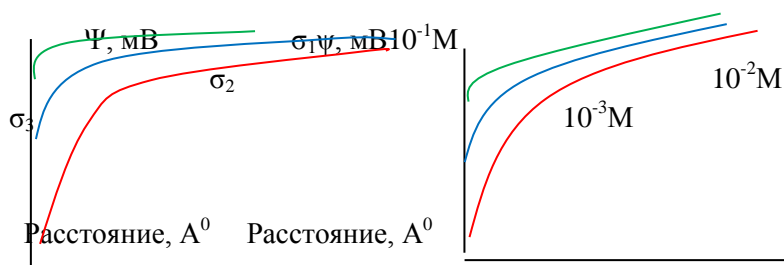


Рис. 8. Зависимость поверхностного потенциала Ψ на мембране клетки от поверхностной плотности заряда

мембраны σ ($\sigma_1 < \sigma_2 < \sigma_3$) (график слева) и от концентрации ионов в среде (график справа). Показано изменение потенциала по мере изменения расстояния до мембраны.

Поверхностные эффекты распространяются на довольно значительные расстояния от мембраны, увеличиваются с повышением плотности заряда мембраны и нивелируются при увеличении ионной силы раствора.

Локальную концентрацию иона при известном электрическом потенциале можно найти с помощью уравнения Больцмана.

$C(x) = C(R)e^{\frac{-zF\Psi(x)}{RT}}$, где $C(x)$, $\Psi(x)$ – концентрация иона и поверхностный потенциал на расстоянии x от мембраны, C^∞ – концентрация иона в растворе (на бесконечно большом расстоянии от мембраны), z – валентность иона, F – постоянная Фарадея.

Рассмотрим, как изменяется локальное значение pH на поверхности мембраны в соответствии с теорией Гюи-Чапмена. Концентрация положительно заряженных протонов вблизи отрицательно заряженной мембраны будет выше, чем в растворе, измеряемом pH-метром. Поэтому кажущееся значение pK_a для протонирования группы A^- на поверхности мембраны определяется следующим образом:

$$K_a = \frac{[A^-]H_{\text{поверх}}^+}{[HA]} = \frac{[A^-]H_{\text{объемн}}^+ \exp(\frac{-F\Psi_0}{RT})}{[HA]},$$

$$-lgK_a = \frac{-lg([A^-][H_{\text{объемн}}^+])}{[HA]} + \frac{F\Psi_0}{2,303RT},$$

$$pK_{\text{ист}} = pK_{\text{аказ}} + \frac{F\Psi_0}{2,303RT}, \text{ где } K_{\text{аказ}} = \frac{[A^-][H_{\text{объемн}}^+]}{[HA]}.$$

Практическая часть.

а) Изучение осмотической резистентности эритроцитов крови доноров и влияние на нее различных физико-химических факторов

Цель работы: Выявить характер зависимости осмотической резистентности эритроцитов крови доноров от содержания хлоридов и сульфатов в среде

Задачи: Установить относительное количество разрушенных эритроцитов при их инкубации в течение 20 мин в средах с различной степенью гипотоничности.

Материал и оборудование: Маточный раствор NaCl (20%), маточный раствор Na_2SO_4 (10%), фотоэлектроколориметр, стеклянная посуда, донорская кровь.

Ход работы:

- Приготовьте в пробирках по 10 мл растворов NaCl следующих концентраций: 0.8%, 0.7%, 0.6%, 0.5%, 0.4%, 0.3% и 0.2%. (*Примечание: для приготовления 0.8% раствора возьмите 8 мл 1% раствора и 2 мл воды, для 0.7% - 7 мл 1% и 3 мл воды, для 0.6% - 6 мл 1% и 4 мл воды и т.д. Суммарный объем приготовленного раствора всегда будет равен 10 мл).

- В каждую из пробирок добавьте дозатором на 0.05 мл одну каплю крови, содержимое перемешайте (не встряхивая) и оставьте на 20 мин, после чего измерьте оптическую плотность в каждой из них (против дистиллята).

- Повторите эксперимент еще 2 раза (можно поставить сразу 3 пробы), по результатам вычислите среднее значение D и ошибку.

- Проведите аналогичные эксперименты (также по 3 раза с раствором Na_2SO_4).

- Постройте график зависимости D от концентрации солей в растворе.

- Сделайте вывод в котором отразите: 1) в каком из растворов резистентность эритроцитов будет выше и 2)

Причины различий по осмотической резистентности в каждом из растворов

б) Исследование кислотной резистентности эритроцитов крови доноров и влияние на нее различных факторов

Ход работы

- Приготовьте по ~ 150 мл растворов 1% NaCl и Na₂SO₄
- Добавляя к этим растворам кровь, доведите их оптическую плотность до 0.6
- Возьмите 4 мл приготовленной суспензии эритроцитов с D=0.6 (в фотометрическую кювету). Добавьте к ней 0.2 мл 0.1 н HCl (дозатором) и **сразу же начинайте отсчет времени при помощи секундомера**. Измерьте значения D суспензии после добавления кислоты через каждые 20 с (в течение 7 – 8 мин). Повторите эксперимент по 3 раза с каждым из растворов (т.е. три эксперимента – с NaCl, и три – с Na₂SO₄).

Результаты оформите по общепринятой схеме, отложив по оси абсцисс время, по оси ординат – значения D. При построении графика используйте средние значения по трем экспериментам. На графике также отобразите ошибку в виде +/- погрешности.

Сделайте выводы о причине наблюдаемых различий в ходе кислотного гемолиза в среде с NaCl и в среде с Na₂SO₄. В выводе укажите, в какой из сред скорость транспорта H⁺ в эритроцит будет выше и как разное значение примембранного зета-потенциала может отразиться на гемолизе клеток

ТЕМА 5. КИНЕТИКА ХИМИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ. ИНГИБИРОВАНИЕ. ЗАВИСИМОСТЬ СКОРОСТИ РЕАКЦИИ ОТ ТЕМПЕРАТУРЫ

Теоретическая часть.

Кинетика изучает скорость и механизм различных химических реакций. Основные законы и понятия кинетики биологических процессов базируются на общих теоретических положениях химической кинетики, изучающих скорость химических реакций.

Кинетика имеет важное теоретическое и практическое значение. Теоретическое значение заключается в исследовании особенностей протекания того или иного процесса, его механизма, и возможности предвидеть направленность процесса. Это в свою очередь позволяет изменять скорость процесса, влиять на расходование исходных веществ, регулировать образование промежуточных соединений и продуктов реакций. Основные положения и математические выкладки, касающиеся основ кинетики обычных реакций и реакций, катализируемых ферментами, зависимость реакций от температуры, подробно рассматриваются в лекционном курсе биофизики. Ниже будут приведены лишь итоговые наиболее важные в практическом плане законы и уравнения.

Уравнение Михаэлиса-Ментен описывает зависимость скорости реакции, катализируемой ферментом, от концентрации субстрата:

$$V = \frac{V_{\max} S_0}{(K_m + S_0)}, \text{ где } V - \text{ скорость реакции, } V_{\max} -$$

максимально возможная скорость реакции (скорость при большом избытке субстрата), K_m -константа Михаэлиса, равная концентрации субстрата, при которой скорость данной реакции равна половине максимально возможной, S_0 – концентрация субстрата. В практических целях для

удобства графического анализа полученных данных удобнее применять обратные величины уравнения – формулу Лайнуивера – Берка:

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max}S_0} + \frac{1}{V_{max}}$$

Пример графика, получаемого при такой записи уравнения, приведен ниже (рис. 9).

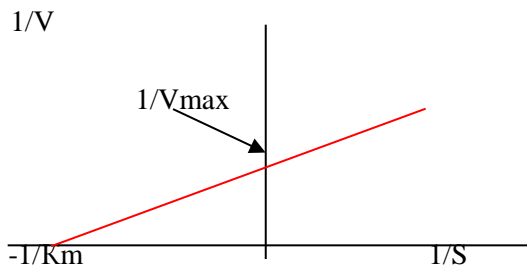


Рис. 9. Зависимость Лайнуивера-Берка для ферментных реакций

Скорость химической реакции зависит от температуры. Согласно правилу Вант-Гоффа, повышение температуры на 10^0 сопровождается увеличением скорости реакции в 2-4 раза. Коэффициент Q_{10} , служащий для характеристики скорости реакции от температуры, равен отношению константы скорости при температуре $(T+10)$ к константе при температуре T . Этот коэффициент можно определить из уравнения Вант-Гоффа $\frac{d \ln K}{dt} = \frac{dH}{RT}$, где K – константа равновесия реакции, dH – изменение энтальпии реакции, R – универсальная газовая постоянная, T – абсолютная температура.

Уравнение Аррениуса выражает зависимость скорости реакции от температуры: $\ln k = \ln A - \frac{E_a}{RT}$, где A – константа, E_a – энергия активации. На рис. 10 показано, как экспериментально определить энергию активации.

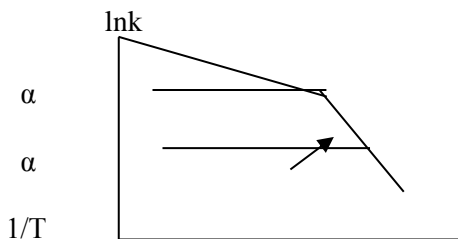


Рис. 10. График Аррениуса.

Энергия активации равна тангенсу угла наклона α . Излом на графике можно объяснить следующими причинами:

- 1) Смена лимитирующей стадии реакции
- 2) Параллельное протекание в реакционной смеси реакций с различными температурными коэффициентами и катализируемые различными активными центрами фермента.
3. Переход фермента в точке излома в другое конформационное состояние с измененным сродством к субстрату.

Практическая часть. Исследование скорости транспорта H^+ через мембрану эритроцитов крови доноров

Как говорилось выше, эритроцитарная мембрана содержит большое количество белков, выполняющих различные функции. За транспорт анионов и протонов через мембрану отвечает белок полосы 3 (б.п.3, капнофорин). На рис. 11 показана схема его функционирования при добавлении в среду с эритроцитами кислоты.

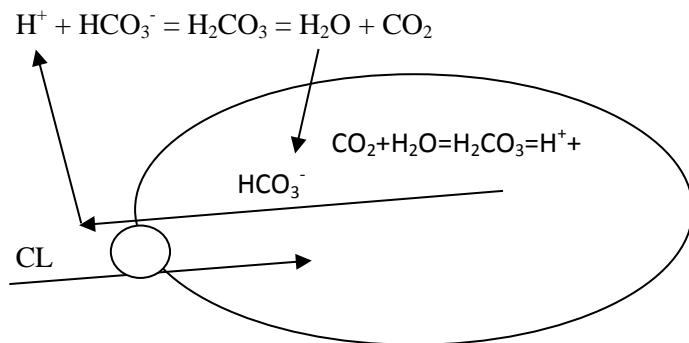


Рис. 11. Реакции цикла Джекобса-Стьюарта

В результате добавления кислоты в среде появляются протоны, которые взаимодействуют с имеющимися в среде гидрокарбонат – ионами HCO_3^- с образованием угольной кислоты. Последняя, в свою очередь, распадается на воду и углекислый газ, быстро диффундирующий в эритроциты, где он вновь реагирует с водой с образованием H^+ и HCO_3^- . Протоны связываются гистидиновыми остатками молекулы гемоглобина, в то время как внутриклеточный бикарбонат транспортируется б.п.З. во внеклеточную среду в обмен на внеклеточный Cl^- . В результате внеклеточное значение pH будет повышаться. Вся совокупность данных реакций называется реакциями цикла Джекобса – Стьюарта, скоростью-лимитирующей ступенью в них будут внеклеточные реакции гидратации – дегидратации CO_2 , но при замене NaCl во внеклеточной среде на Na_2SO_4 , либо при действии на эритроциты ингибиторами анионного обмена, лимитирующей ступенью становится скорость оборота б.п.З. Таким образом, при соответствующих условиях по изменению внеклеточного pH можно судить о скорости работы б.п.З. В ряде работ показано, что его функционирование можно проанализировать с точки зрения кинетики ферментативных реакций.

Цель работы: проанализировать скорость работы б.п.3 мембраны эритроцитов в различных условиях.

Задачи: определить скорость изменения pH суспензии эритроцитов:

1) В 0.9% NaCl при комнатной температуре и температуре 37°C

2) В 0.9% Na₂SO₄ при комнатной температуре и 37°C

3) После предварительной инкубации эритроцитов с фурсемидом (блокатором б.п.3)

4) Построить зависимость Лайнуивера-Берка, график Вант-Гоффа для соответствующих экспериментов. Найти E_a, dH, Q₁₀. Определить характер ингибирования б.п.3 фурсемидом (конкурентное, неконкурентное, смешанное).

Материалы и оборудование: донорская кровь, иономер, мерная посуда, 0.01 н HCl, секундомер, магнитная мешалка, термостатируемая ячейка для измерения pH, фурсеמיד, 10% раствор Na₂SO₄, 20% раствор NaCl, центрифуга.

Ход работы:

1. Приготовьте 10 пробирок, в пять первых добавьте по 2 мл 1% NaCl, в пять других – по 2 мл 1% Na₂SO₄.

2. Эксперименты с NaCl. Добавьте в пробирки с NaCl: в первую – ничего не добавляем (контроль), во вторую – 0.02 мл фурсемида, в третью – 0.04 мл фурсемида, в четвертую – 0.06 мл фурсемида, в пятую – 0.02 мл фурсемида (как и во вторую). *Примечание – 0.02 мл соответствует одной капле раствора из дозатора. Далее в каждую пробирку добавьте по 0.05 мл крови (зеленый дозатор).

3. По аналогии добавьте компоненты в пробирки с 1% Na₂SO₄.

4. Поставьте все пробирки в термостат на 30 мин при 37°C. В течение этого времени происходит уравнивание

в системе эритроцит – среда и связывание фуросемида с эритроцитарной мембраной.

6. Пока происходит термостатирование, настройте рН-метр по буферу 6.86. Затем приготовьте примерно по 150 мл растворов 1% NaCl и 1% Na₂SO₄ и доведите рН этих растворов до 5 ± 0.05 .

7. Ход эксперимента после термостатирования суспензии эритроцитов.

Возьмите 15 мл приготовленного раствора с рН 5, не вынимая электродов, добавьте к этому раствору суспензию эритроцитов из пробирки (начинайте с контроля). Сразу же после добавления суспензии начинайте отсчет времени при помощи секундомера. Запишите показателя рН метра через каждые 10 секунд в течение 1 мин (т.е. всего 6 показателей с одной пробы). Вымойте посуду для рН-метрирования и повторите эксперименты с остальными пробирками кроме последних с 0.02 мл фуросемида в NaCl и Na₂SO₄.

8. Проведите эксперименты с последними пробирками после нагревания раствора с рН 5 до 36⁰С.

Результаты экспериментов оформите по общепринятой схеме (см. методичку по биофизике).

Контрольные вопросы

1. Предмет кинетики. Порядок реакции и его определение.

2. Особенность реакций, катализируемых ферментами.

3. Вывод уравнения Михаэлиса-Ментен равновесным методом и методом стационарного состояния. Смысл V_{max}, K_m, k₂ в уравнении Михаэлиса-Ментен. Графический анализ скорости ферментной реакции.

4. Ингибирование, как один из вариантов регуляции скоростей реакций. Типы ингибирования. Графический анализ характера ингибирования.

5. Другие типы регуляции скоростей химических реакций.

6. Соотношение Онзагера для двух взаимосвязанных процессов, его приложение к биохимическим реакциям (условия протекания, термодинамически невыгодные реакции).

7. Почему при повышении температуры среды, в которой протекает реакция, катализируемая ферментом, скорость реакции сначала повышается, но по мере дальнейшего увеличения температуры начинает падать?

8. Температурная зависимость химических реакций. Вывод уравнения Вант-Гоффа и Аррениуса. Смысл констант в уравнении Аррениуса согласно теории переходного состояния. Графический анализ температурной зависимости катализируемой реакции.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

Список основной литературы:

1. Иванов И.В. Основы физики и биофизики: учебник для вузов / И. В. Иванов. - 2-е изд., испр. и доп. - Санкт-Петербург: Лань, 2022. ЭБС.

2. Волькенштейн, М. В. Биофизика: учебное пособие / М. В. Волькенштейн. - 4-е изд., стер. - Санкт-Петербург: Лань, 2022. - 608 с. - ISBN 978-5-8114-0851-1. - Текст: электронный // Лань: электронно-библиотечная система. - URL: <https://e.lanbook.com/book/210956>

Список дополнительной литературы:

1. Антонов В.Ф. и др. Биофизика. М.: Владос. 2000.

2. Антонов В.Ф., Коржув А.В. Физика и биофизика: Курс лекций для студентов медицинских вузов: Учебное пособие. М.: Гум. издат. центр "Владос". 2004.

3. Журавлев А.Н. и др. Основы физики и биофизики. Серия: Учебники и учебные пособия для студентов высших учебных заведений. 2005.

4. Биофизика / Картя Молдовянскэ, отв. ред. Г.Я. Рудь. - Кишинев: 1966.

5. Основы физики и биофизики / А. И. Журавлев; под ред. проф. А.И. Журавлева. - Москва: Мир, 2005.

6. Основы физики и биофизики: метод. указ./И.С. Бзинковская. - Новосибирск, 2000.

7. Основы физики и биофизики: методические указания / Новосиб. гос. аграр. ун-т; сост.: С.Г. Штейн, С.В. Викулов, И.М. Дзю. - Новосибирск: НГАУ, 2009.

8. Рубин А.Б. Биофизика. М.: МГУ. 2004. Т. 1 – 2.

Составители:

Смирнов Павел Николаевич

Ефанова Нина Владимировна

Осина Людмила Михайловна

Баталова Светлана Владимировна

БИОФИЗИКА

методические указания
по выполнению лабораторных работ

Редактор Н.К.Крупина

Издательство НГАУ
630039, Новосибирск, ул. Добролюбова, 160