

Лабораторна робота № 6

ВИВЧЕННЯ ФОТОДИНАМІЧНОГО ГЕМОЛІЗУ ЕРИТРОЦИТІВ

Мета роботи: дослідити явище фотодинамічного гемолізу еритроцитів.

Матеріали, обладнання, реактиви: ФЕК, освітлювач, мірні циліндри, піпетки, колби, пробірки, посудина з плоскопаралельними стінками, фізіологічний розчин, розчин сульфату міді 0,5 %, розчин еритрозину 0,04% та 0,004 %, дистильована вода, суспензія еритроцитів, 0,1М розчин $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

Основні відомості

Фотобіологія вивчає закономірності та механізми дії світла на біологічні об'єкти. **Фотобіологічні процеси** протікають під дією випромінювання в ультрафіолетовій, видимій та близької інфрачервоної області спектру. У відповідності з різноманітністю біологічних реакцій, пов'язаних з дією світла, сучасна фотобіологія диференціювалась на ряд самостійних дисциплін, які вивчають певні фотобіологічні процеси. Так виникли проблеми фотосинтезу, зору, морфогенезу, мутагенезу і т.п. У свою чергу окремий фотобіологічний процес є складною послідовністю різноманітних стадій, які розпочинаються з моменту поглинання кванту, та закінчуються різноманітними біохімічними, фізіологічними ефектами. Ці стадії настільки різні за своєю природою, що вимагають послідовної зміни підходів дослідження.

Основні стадії фотобіологічного процесу із зазначенням деяких методів можна уявити у вигляді схеми.

Для фотобіології в основному типовими є одноквантові фотохімічні реакції. Відомі такі одноквантові фотохімічні реакції органічних молекул:

1. **Фоторозпад**, при якому з розривом хімічних зв'язків відбувається розпад молекул на радикали, Іони або нейтральні молекули.

2. **Фотоперегрупування**, в ході яких один ізомер або таутомер перетворюється в інший.

3. **Фотоприєднання**. Сутність цієї реакції - приєднання до активованої молекули інших молекул.

4. **Фотоперенос електронів**, при якому активована молекула віддає свій електрон іншій, неактивованій молекулі, або навпаки, одержує зайвий електрон.

5. **Фотоперенос протону**. Сутність цієї реакції - приєднання до активованої молекули протону від неактивованої кислоти або навпаки - у

віддаванні активованою кислотою свого протону основі.

На такі об'єкти, як клітини та тканини тварин, видиме світло звичайно помітно не впливає. Однак, в присутності деяких барвників, освітлення призводить до пошкодження та загибелі клітин. Це явище носить назву **фотодинамічної дії**. Які молекулярні структури клітини в цьому випадку пошкоджуються в першу чергу, визначається з одного боку, природою барвника, а з іншого - особливостями біологічного об'єкту: проникністю клітин для барвника, його мікророзподілом у середині клітини. Природа акцептора фотодинамічного активного світла очевидна. Це проникаючий в клітину барвник. З утворенням збудженого стану барвника починається ланцюг подій, які ведуть до **біологічного ефекту**. При цьому найбільш ефективно будуть руйнуватися ті речовини, з якими барвник з-за підвищеного сприяння утворює комплекс, або знаходиться в безпосередній близькості. Численними дослідженнями вдалося показати, що фотодинамічним шляхом окислюються практично всі біологічно важливі речовини.

ХІД РОБОТИ

Завдання № 1. Вивчення гемолізу за допомогою ФЕКу ($\lambda = 610$ нм).

При руйнуванні еритроцитів (гемоліз) відбувається зменшення мутності суспензії і збільшення світлопропускання: розчин стає більш прозорим, Тому зміна пропускання суспензії еритроцитів може слугувати мірою гемолізу. Пропускання еритроцитів можна виміряти на фотоелектроколориметрі (ФЕК). Аби поглинання гемоглобіну не заважало вимірюванню світлорозсіювання, вивчення гемолізу проводять з червоним світлофільтром у спектральній області, де гемоглобін не поглинає, і всі зміни світлопропускання пов'язані виключно зі зміною мутності розчину (світлорозсіюванням).

Приготувати 1% суспензію еритроцитів криси в фізіологічному розчині. Дві проби суспензії розвести в 10 разів: одну - дистильованою водою, іншу - фізіологічним розчином. Пропускання обох розчинів виміряти за допомогою ФЕКу з червоним світлофільтром. Розчином-еталоном є дистильована вода.

Завдання № 2. Вивчення гемолізу еритроцитів під дією освітлення в присутності барвника.

В якості джерела для опромінення суспензії еритроцитів використовують лампу в 500 Вт. Пробірки з суспензією, що опромінюються поміщають на відстань 25 см від лампи. Щоб виключити нагрівання інфрачервоним випромінюванням лампи, між нею та суспензією поміщають скляну посудину з плоскопаралельними стінками, який заповнено 0,5% розчином сульфату міді (товщина шару повинна бути близько 5-ти см).

Приготувати 1% суспензію відмитих еритроцитів та 0,04% розчин еритрозину на фізіологічному розчині. В дві пробірки налити по 9 мл. розчину еритрозину та додати в кожен пробірку по 1 мл 1% суспензії еритроцитів (проби 1, 2).

У дві контрольні пробірки налити по 9 мл фізіологічного розчину та по 1 мл 1% суспензії еритроцитів (проби 3, 4).

. Ретельно перемішати розчини в усіх пробірках. Виміряти світло пропускання за допомогою ФЕКу. Проби 1 та 3 опромінити, проби 2, 4, які є контролем, в цей час повинні знаходитися в темряві за тієї ж (кімнатної) температури; потім вимірювати через кожні 15 хвилин протягом години. В якості еталонного розчину використовують 0,04 % розчин еритрозину на фізіологічному розчині. Дані занести до таблиці 1.

Результати вимірювання представити у вигляді графіку залежності пропускання (D) від часу опромінення (t) для всіх чотирьох проб.

Таблиця 1

Варіант	№ пробірки			
	1	2	3	4
1% суспензія еритроцитів	1 мл	1мл	1мл	1мл
0,04% розчин еритрозину на віт. Розчині	9 мл	9 мл	-	-
Фізіологічний розчин	-	-	9 мл	9 мл
Освітлення	+	-	+	-
Показники ФЕКу (D) Початкові дані через 15 хвилин 30 хвилин 45 хвилин 60 хвилин				

Завдання № 3. Вплив антиоксидантів на фотодинамічний гемоліз.

Оскільки в ряді випадків у основі фотодинамічної дії лежить реакція фотоокислення білків за рахунок світлової енергії, поглиненої барвником, швидкість та ступінь фотодинамічного гемолізу можна зменшити, додаючи до суспензії еритроцитів речовину антиокислювального характеру. В якості однієї з них можна використати гіпосульфід натрію ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$).

Таблиця 2

Варіант	№ пробірки			
	1	2	3	4
1 % суспензія еритроцитів у 0,004% розчині еритрозину	9 мл	9 мл	9 мл	9 мл
0,1 М розчину гіпосульфиту натрію ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	1 мл	1 мл	-	-
Фізіологічний розчин	-	-	1 мл	1мл
Освітлення	+	-	+	-
Показники ФЕКу (D) Початкові дані через 15 хвилин 30 хвилин 45 хвилин 60 хвилин				

Приготувати 4 пробірки, у які наливо по 9 мл 1 % суспензії еритроцитів у 0,004% розчині еритрозину, який приготували на фізіологічному розчині.

У 2 пробірки (проби 1 та 2) додати по 1 мл 0,1 М розчину гіпосульфиту

(розчин цієї концентрації ізотонічний фізіологічному розчину та не викликає гемолізу). У 2 інші пробірки (проби 3 та 4) додати по 1 мл фізіологічного розчину, щоб концентрація суспензії еритроцитів у досліді та контролі була однаковою. Ретельно перемішати розчин в усіх пробірках, виміряти світлопропускання за допомогою ФЕКу. Проби 1 та 3 опромінити, проби 2 та 4 тримати в темряві. Через кожні 15 хв вимірювати світлопропускання проб протягом години. В якості розчину-еталону використовують 0,004 % розчин еритрозину. Отримані дані занести до таблиці 2.

Результати вимірювання представити у вигляді графіку залежності пропускання (D) від часу, який пройшов після опромінення (t), для всіх чотирьох проб.

Питання для самоконтролю

1. Що таке фотобіологічні процеси.
2. У чому полягає явище фотодинамічного гемолізу еритроцитів?
3. Пігменти, що приймають участь у фотобіологічних процесах.
4. Закономірності фотобіологічних процесів.
5. Фотофізична і фотохімічна стадії фотобіологічних процесів.
6. Механізми міграції енергії електронного збудження.
7. Механізми переносу збудженого стану (обмінно-резонансний, індуктивно-резонансний)
8. Що називається реабсорбцією.
9. Елементарні фотохімічні реакції (фотодисоціація та фотоіонізація).
10. Закони фотохімії.
11. Фотоокисдування, фотогідроліз, фотосенсибілізація.
12. Природні фотосенсибілізуючі речовини.