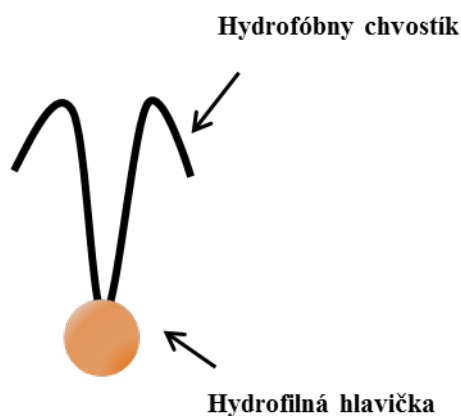


Určenie hrúbky membrány z kapacitných meraní

Teoretická časť

Bunka je najmenšou stavebnou a funkčnou jednotkou všetkých živých organizmov. Ide o samoreprodukčnú sústavu molekúl prietorovo ohraničenú tenkou plazmatickou membránou – vrstvou tuku. Stavba membrány je jednoduchá: ide o dvojvrstvu lipidových molekúl s hrúbkou asi 5 nm, t. j. 50 atómov. Svojimi vlastnosťami sa nepodobá žiadnemu materiálu, ktorý je známy z bežného života. Zodpovedá za veľké množstvo funkcií. Keď bunka rastie, alebo mení tvar, membrána zväčšuje svoj povrch pridávaním nových membránových zložiek bez straty celistvosti a môže sa deformovať bez toho, aby sa potrhala. Lipidová dvojvrstva je základ štruktúry bunkových membrán [1].

Lipidy spájajú v každej svojej molekule dve úplne odlišné vlastnosti: majú hydrofilnú hlavičku a dva hydrofóbne konce (obr. 3.1). Molekuly, ktoré majú hydrofilné aj hydrofóbne vlastnosti, sa nazývajú amfipatické alebo amfifilné.



Obr. 3.1: Štruktúra molekuly lipidu.

Najviac zastúpenými lipidmi v bunkovej membráne sú fosfolipidy a z nich je najrozšírenejší fosfatidylcholín. Fosfolipidy sa v rámci dvojvrstvy dokážu pohybovať, môžu podliehať laterálnej difúzii, rotácii alebo preklápaniu. V živočíšnych membránach je tekutosť membrány znižovaná prítomnosťou cholesterolu, ktorý u rastlín alebo kvasiniek chýba. Cholesterol vyplňa medzery medzi susednými fosfolipidovými molekulami, čím ju spevňuje a robí z nej vrstvu menej tekutú a menej priepustnú. Aj keď je lipidová dvojvrstva základnou štruktúrou všetkých bunkových membrán a slúži ako nepriepustná zložka, väčšinu špecifických funkcií plnia membránové proteíny. U živočíchov predstavujú asi 50 % hmotnosti väčšiny plazmatických membrán, pričom zvyšok tvoria lipidy a pomerne malý podiel uhľovodíky [1]. Proteíny sú do dvojvrstvy buď zabudované (integrálne) alebo adsorbované na povrch membrány (pripojené periférne). Každý z prítomných proteínov zohráva v membráne inú úlohu (receptory, kanály. . .). Správna činnosť membrán je nevyhnutná pri repro-

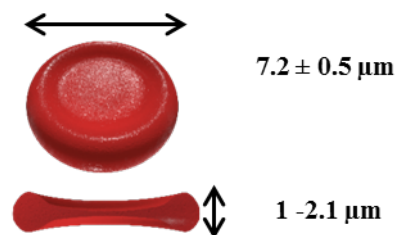
dukcii a mnohých fyziologických procesoch. Kontrolujú chemické zloženie a koncentráciu molekúl v jednotlivých bunkových štruktúrach a podieľajú sa na prenose informácie.

Správanie sa biologických membrán je možné testovať pomocou umelo vytvorených štruktúr simulujúcich bunkový obal. V prípade vloženia lipidov do vodnej fázy dochádza k formovaniu rozličných agregátov, ako napr. micely alebo lipozómy. Ide o skupinu guľových lipidových vrstiev/dvojvrstiev, na ktorých možno následne testovať napríklad prechod či zabudovávajú nanoštruktúry do buniek. Vezikuly (lipozómy, micely) sa pripravujú rozličnými spôsobmi. Lipozómy je možné pripraviť tzv. Banghamovou alebo pH gradientovou metódou.

Na meranie fyzikálnych charakteristík a rozličných interakcií membrán s látkami môžeme teda použiť syntetickú náhradu biologických membrán (lipozómy) alebo prirodzený materiál, bunky, (napr. erytrocyty).

Zrelé červené krvinky (erytrocyty) zaraďujeme medzi najšpecializovanejšie bunky ľudského organizmu. Ich hlavnou funkciou je transport krvných plynov – kyslíka O_2 a oxidu uhličitého CO_2 . Nejde o pravé bunky, pretože v čase dozrievania stratili jadro a aj ostatné bunkové organely [2]. Ich tvorba prebieha v kostnej dreni. Kostná dreň je mäkké tkanivo vyplňajúce všetky vnútorné dutiny kostí. Podľa farby rozoznávame červenú a žltú dreň. Červená dreň je hematopoeticky aktívna a jej farba je daná vysokým obsahom červených krviniek. Všetky krvinky sa odvodzujú z jednej populácie multipotentých hemopoetických kmeňových buniek v kostnej dreni. V procese erytropoézy sa bunky diferencujú. Výsledným štádiom diferenciácie je retikulocyt, bezjadrová bunka so zvyškami bunkových organel. Retikulocyt musí ešte tri dni dozrieť, aby sa ako *normocyt* – zrelý erytrocyt mohol uvoľniť do cirkulujúcej krvi. Erytropoéza trvá približne 8 dní [3].

Erytrocyty sú bunky tvaru bikonkávneho disku, ktoré majú v priereze *piškótový* tvar (obr. 3.2). Priemer erytrocytu je $7,2 \pm 0,5 \mu\text{m}$, maximálna hrúbka je $2,1 \mu\text{m}$ a minimálna $1 \mu\text{m}$ [2].



Obr. 3.2: Erytrocyt

Erytrocyt tvorí zo 65 % až 70 % voda a na sušinu pripadá 30 % až 35 %, z čoho až 95 % predstavuje červené farbivo hemoglobín. Počet červených krviniek sa pohybuje u žien v rozmedzí od $3,8 \cdot 10^{12}$ do $4,8 \cdot 10^{12} \ell^{-1}$ a u mužov od $4,3 \cdot 10^{12}$ do $5,3 \cdot 10^{12} \ell^{-1}$. Rozdielne počty erytrocytov medzi pohlaviami spôsobujú pohlavné hormóny. Androgény (testosterón) vo všeobecnosti erytropoézu stimuluje. Estrogény, naopak, produkciu erythropoetínu inhibujú,

z tohto dôvodu je počet erytrocytov u žien nižší [2]. Životnosť červených krviniek je približne 120 dní, po ktorých zanikajú v pečeni alebo slezine.

V tomto laboratórnom cvičení budeme na charakterizáciu lipidovej dvojvrstvy používať práve červené krvinky. Hrúbku lipidovej dvojvrstvy membrán môžeme merať pomocou elektrickej kapacity erytrocytovej suspenzie. Membránovú kapacitu určíme zo vzťahu:

$$c_m = \frac{C_k}{12\pi D^2} \quad (3.1)$$

kde D je priemer bunky, c_m je kapacita dvojvrstvy na jednotku plochy a C_k je kapacita červených krviniek. Hrúbku membrány h určíme z nasledujúceho vzťahu:

$$c_m = \frac{\varepsilon_0 \varepsilon_r}{h} \quad (3.2)$$

ε_0 je elektrická konštanta a $\varepsilon_r \approx 5$ je relatívna permitivita vnútra membrány.

Experimentálna časť

Úlohy

1. Odmerajte priemer erytrocytu a získanú hodnotu porovnajte s tabuľkovou hodnotou.
2. Vypočítajte hrúbku membrány erytrocytu pomocou merania plošnej kapacity membrány.

Prístroje a pomôcky

Q-meter, komôrka na meranie kapacity, prípojné káble, rukavice, podložné a krycie sklíčka, mikroskop s digitálnou kamerou, papierové obrúsky.

Chemikálie

Suspenzia červených krviniek – erytrocytov, etanol, destilovaná voda.

Postup merania a vyhodnotenie

1. Zmerajte priemer červených krviniek pomocou mikroskopu a digitálnej kamery.
2. Z niekoľkých získaných priemerov erytrocytov určte priemernú hodnotu.
3. Pripravte suspenziu erytrocytovej zmesi na meranie v kapacitnej komôrke.
4. Odmeriame závislosť kapacity erytrocytovej zmesi od frekvencie pre rozsah od 18 MHz do 35 MHz.
5. Extrapoláciou závislosti $C(1/f)$ odhadnite C_0 .

6. Vypočítajte kapacitu vody C_v a určte $C_k = C_0 - C_v$, kde $C_v = \varepsilon_0 \varepsilon_{rv} S/d$.
7. Vypočítajte plošnú kapacitu membrány c_m podľa vzťahu (3.1).
8. Vypočítame hrúbku membrány erytrocytu h podľa vzťahu (3.2).
9. Získané výsledky zosumarizujte a porovnajte ich s teoretickými hodnotami.

Spracovanie výsledkov

Tabuľka 3.1: Závislosť kapacity od frekvencie

	Suspenzia erytrocytov				
č. merania	1	2	3	4	5
f (MHz)					
C (pF)					

Literatúra

- [1] Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Walter, P., Roberts, K., Raff, M. Základy bunecnej biologie: Úvod do molekulárnej biologie bunky. 1998. Garland Publishing, Inc. New York. Espero Publishing, s.r.o. Ústí nad Labem. ISBN 80-902906-0-4. s. 630.
- [2] Javorka, K. a kol. Lekárska fyziológia učebnica pre Lekárske fakulty, tretie, prepracované a doplnené vydanie. 2009. Vydavateľstvo Osveta, spol. s.r.o. Martin, Slovenská republika. ISBN 978-80-8063-291-5. s. 742.
- [3] Renate Lullmann-Rauch. Histologie, Preklad 3. vydání, 2012, Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, Germany, ISBN 978-3-13-129243-8, ISBN 978-80-247-3729-4. s. 576.