

ТРАНСПОРТ ВЕЩЕСТВ ЧЕРЕЗ ПЛАЗМАТИЧЕСКУЮ МЕМБРАНУ.

Цель:

1. Получить представление о селективной проницаемости плазматической мембраны.
2. Уметь описывать различные механизмы, посредством которых молекулы вещества могут пассивно пересекать плазматическую мембрану.
3. Уметь описывать различные механизмы, посредством которых молекулы вещества могут активно транспортироваться через плазматическую мембрану.
4. Понять и уметь объяснить различия между работой мембранных транспортеров с расходом энергии клеток и без нее.
5. Дать определение пассивному и активному транспорту, простой и облегченной диффузии, осмосу и транспорту веществ между гипотоническими, изотоническими и гипертоническими растворами.

Теоретическая часть.

Каждая клетка нашего организма окружена плазматической мембраной (ПМ), которая отделяет ее от интерстициальной жидкости. Одной из основных функций ПМ является *селективная проницаемость* при обмене молекул между клеткой и окружающей жидкостью, для того, чтобы клетка могла отобрать субстанции, необходимые ей, и избавиться от ненужных веществ. Эти субстанции включают в себя газы (O_2 и CO_2), ионы и более крупные молекулы, такие как глюкоза, аминокислоты, жирные кислоты, витамины.

Молекулы вещества транспортируются через ПМ *пассивно* или *активно*. При *активном* транспорте вещества через ПМ расходуется энергия, выделяющаяся при распаде АТФ, а при *пассивном* транспорте молекулы проходят через ПМ без расхода какой-либо энергии. Примером пассивного транспорта являются простая диффузия, осмос и облегченная диффузия.

Простая диффузия - это спонтанное движение молекул через липидный бислой ПМ из области с более высокой концентрацией в область с более низкой концентрацией вещества. *Осмос* это диффузия растворителя (H_2O) через плазматическую мембрану. *Облегченная диффузия* - это движение молекул через селективно проницаемую мембрану с помощью специализированных транспортных белков ПМ.

На этом занятии мы будем моделировать каждый из этих клеточных транспортных механизмов, используя модели виртуального практикума.

ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ ПРОСТОЙ ДИФфуЗИИ

В данной работе имитируются процессы простой диффузии через плазматическую мембрану.

Для выполнения работы открываем в главном меню работу «Симуляция простой диффузии» (**Simulating Simple Diffusion**) (рис. 1).

Обращаем внимание на два стеклянных сосуда в верхней части экрана, которые мы будем заполнять жидкостью с различными веществами. Примем условно, что правый сосуд представляет собой внутреннее содержимое клеток, а левый сосуд - внеклеточную жидкость. Между этими сосудами находится мембранный держатель, в который мы будем помещать одну из четырех диализных мембран (**Dialysis Membrane**), находящихся с правой стороны экрана. Каждая из этих мембран обладает селективной проницаемостью к определенному молекулярно-весовому показателю вещества (**MWCO, Molecular Weigh Cut Off**). Вещества с молекулярным весом меньше указанного значения (20; 50; 100; 200) будут проходить через мембрану, а молекулы с большим весом - нет. Чтобы переместить мембрану в держатель, необходимо сделать щелчок левой кнопкой мышки на мембране и перенести ее к мембранному держателю между двумя сосудами.

Рисунок 1. Модель селективной мембраны для изучения простой диффузии.



Ниже каждого из сосудов с левой и правой стороны экрана, находятся панели, отражающие содержание веществ в растворах. С их помощью мы можем поместить необходимое количество миллимолей (**mM**) различных растворенных веществ (**Na/Cl**, мочевины (**urea**), альбумин (**albumin**) и глюкоза (**glucose**)) в каждый из сосудов - посредством щелчка на (+) или (-) кнопках, ниже каждого из названий растворенного вещества. Также, мы можем залить дистиллированную воду (**Deionizer Water**) в любой из сосудов, нажимая мышкой на кнопку. Пользуясь кнопками «распределение» (**Dispense**) под каждым сосудом мы будем заполнять их жидкостью. Активируя кнопки «Промывка» (**Flush**) мы будем опорожнять сосуды.

На самой нижней панели экрана находится таблица регистрации полученных измерений каждого эксперимента, которые можно записать, используя кнопку «Зарегистрировать результат» (**Record date**). Если вы хотите убрать результаты какого-либо эксперимента, необходимо выделить нужную строку показателей, а затем нажать кнопку «Уничтожить ряд» (**Delete Run**). Для распечатки результатов необходимо нажать кнопку «Инструменты» (**Tools**) на верхней части экрана и затем кнопку «Распечатать результат» (**Print Data**).

Ход работы:

1. Используя «мышку», выбрать щелчком кнопки диализную мембрану с MWCO = 20 и поместить ее в мембранный держатель.
2. Установить концентрацию (**mM**) **Na/Cl** для левого сосуда на 9 mM, нажимая кнопку (+). Затем нажать кнопку **Dispense** (распределение) под левым сосудом, заполняя его.
3. Нажать кнопку **Deionizer Water** (дистиллированная вода) под правым сосудом и **Dispense** (распределение) под ним, заполняя его.
4. Нажимая кнопку (+) около экрана «Время» (**min**), можно установить время от 60 секунд до 60 минут.
5. Нажать кнопку «**Start**» и запустить процесс на выбранный Вами период времени. Обратите внимание, что мембранный контейнер опускается при этом в поддерживающее устройство. Кроме этого, кнопка «**Start**» теперь является и кнопкой «Пауза», которую можно использовать для остановки эксперимента.
6. Когда экран «Прошедшее время» (**Elapsed Time**) покажет 60, значения концентрации веществ читаются для каждого сосуда на соответствующей стороне экрана.
7. Как только «Прошедшее время» (**Elapsed Time**) достигнет 60, вы будете извещены строкой экрана, что равновесие достигнуто.
8. Нажмите кнопку «Зарегистрировать результат» (**Record date**) для записи данных этого эксперимента.

9. Нажмите кнопку «Промывка» (**Flush**) слева и справа, чтобы опорожнить сосуды.
10. Верните диализную мембрану в ее исходное положение, перемещая ее в мембранную камеру.
11. Повторите этапы 1-10 для других диализных мембран. Регистрируйте результаты каждого эксперимента, после чего промывайте сосуды и возвращайте в камеру диализную мембрану.

Обсуждение результатов:

Обратитесь к периодической таблице элементов и ответьте на вопросы:

1. Каков молекулярный вес Na^+ ? _____
2. Каков молекулярный вес Cl^- ? _____
3. Какой MWCO диализной мембраны позволяет этим ионам проходить через нее? _____
12. Повторите этот эксперимент, помещая оставшиеся растворенные вещества (мочевине, альбумин и глюкозе) в левый сосуд и дистиллированную воду (**Deionizer Water**) - в правый сосуд. Регистрируйте результаты, пользуясь кнопкой **Record date**, промывайте сосуды (**Flush**) и заменяйте диализную мембрану после каждого эксперимента. Нажимая кнопку «Инструменты» (**Tools**) и «Распечатать результат» (**Print Data**), получите распечатку результатов ваших экспериментов.
13. Заполните таблицу с вашими результатами.

Таблица № 1.

Растворённое вещество	Имеет место диффузия?			
	Мембрана (MWCO)			
	20	50	100	200
NaCl				
Мочевина				
Альбумин				
Глюкоза				

14. Сделайте заключение:

1. Какие вещества диффундируют из левого сосуда в правый?
2. Какие вещества не делают этого?
3. Почему?

Работа №2.

МОДЕЛИРОВАНИЕ ДИАЛИЗА

Механизмы диализа используются у пациентов, имеющих нарушение функции почек. Мочевина, как продукт разрушения аминокислот, должна удаляться из крови пациентов, так как она является токсичной для организма и может приводить к летальному исходу. Механизмы диализа применяют для очищения крови, пропуская ее через селективно проницаемую мембрану искусственной почки с целью удаления мочевины из крови. С одной стороны мембраны нашей модели находится кровь пациента, а с другой стороны - жидкости с заданными концентрациями веществ, таких как Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , HCO_3^- , которые необходимы для организма. Моделируем этот процесс:

Ход работы:

1. Поместить диализную мембрану 200 MWCO в мембранный держатель.
2. Заполнить левый сосуд 10 mM каждого из четырех растворенных веществ и нажать кнопку «Распределение» (**Dispense**). Этот сосуд будет представлять собой диализируемую кровь пациента.
3. Заполнить правый сосуд подобным образом, но с концентрацией мочевины 0 mM, то есть правый сосуд не будет содержать мочевины.
4. Установить «Время» на 60 минут и нажать кнопку «Старт», ожидая, когда экспериментальный период времени закончится.
5. Сделайте заключение:
 1. Что происходит с концентрацией мочевины в левом сосуде (пациент)?
 2. Почему это происходит?

Работа №3.

ОБЛЕГЧЕННАЯ ДИФфуЗИЯ

Нажимаем на кнопку эксперимент на верхней панели экрана. Выбираем раздел облегченная диффузия (**Facilitated Diffusion**), появляется новый экран (рис. 2).

Отметим, что существует два ключевых отличия от первой работы. Во-первых, на месте диализных мембран с правой стороны экрана имеется «Мембранный построитель» (**Membrane builder**), который будет использоваться для изготовления мембран, транспортирующих молекулы из одного сосуда в другой. Во-вторых, в этом эксперименте мы будем работать только с глюкозой и Na^+/Cl^- .

Рисунок 2. Модель селективной мембраны для изучения облегченной диффузии.



Ход работы:

1. Заметим, что экран переносчика глюкозы установлен на 500. Нажимаем на кнопку «Построить мембрану» (**Build membrane**), чтобы создать мембрану с 500 переносчиками глюкозы.
2. Переместить эту мембрану к мембранному держателю между двумя сосуда.
3. Для левого сосуда, установить Na^+/Cl^- на 9 mM и глюкозу на отметке 9 mM с помощью соответствующих кнопок «+» или «-». Затем нажать на кнопку «**Dispense**» для заполнения левого сосуда.
4. Для заполнения правого сосуда, нажать на кнопку «Дистиллированная вода» (**Deionizer Water**) ниже сосуда и затем кнопку «Распределение» (**Dispense**).
5. Установить таймер на 60 минут и нажать кнопку «**Start**».
6. Когда время достигнет 60, нажимаем на кнопку «Зарегистрировать результат» (**Record date**), чтобы зарегистрировать результаты эксперимента и перенести их в таблицу №2.

7. Нажать кнопку «Промывка» (**Flush**) под каждым сосудом, чтобы их опорожнить, а затем вернуть мембрану к мембранному построителю.
8. Строим новую мембрану с 300 переносчиками и повторяем этот эксперимент. Регистрируем результаты, промываем сосуды и возвращаем мембрану в исходное положение после каждого опыта.
9. Строим мембрану с 700 и 900 глюкозными переносчиками и повторяем эксперимент.
10. Для сравнения устанавливается самая низкая концентрация глюкозы 3 mM и повторяются эксперименты в порядке, указанном в пунктах 1 - 9, также регистрируются результаты и заполняется таблица №2.

Таблица №2.

Результаты облегченной диффузии				
Раствор (solute)	Плотность переносчиков MWCO (Carriers)	Стартовая концентрация слева (Start conc. L)	Стартовая концентрация справа (Start conc. R)	Скорость диффузии mM/min (Rate)
глюкоза	300			
NaCl	300			
глюкоза	500			
NaCl	500			
глюкоза	700			
NaCl	700			
глюкоза	900			
NaCl	900			

11. Нажмите кнопку «Инструменты» (**Tools**) - Распечатать результат» (**Print date**), чтобы распечатать данные.
12. Сделайте заключение:
 1. При данной концентрации глюкозы, какое количество времени требуется для изменения равновесия? и с какой плотностью переносчика для транспорта глюкозы?
 2. Меняется ли уровень диффузии Na^+/Cl^- от плотности переносчика
 3. Каков механизм Na^+/Cl^- транспорта?
 4. Если вы имеете равное количество глюкозы в правом и левом сосудах, будет ли наблюдаться какая либо диффузия?

ОСМОС

Нажать на кнопку «Эксперимент» на верхней панели экрана «Содержание» и выбрать раздел «Осмоз» (**Osmosis**). Появляется новый экран (рис. 3). Этот экран сходен с первым, который мы использовали во время эксперимента по «Простой диффузии». Основное отличие заключается в том, что над каждым сосудом находится индикатор давления, который включается во время эксперимента.

Рисунок 3. Модель селективной мембраны для изучения осмоса.



Ход работы:

1. Возьмите 20 MWCO мембрану и установите ее между двумя сосудами.
2. Установить Na^+/Cl^- концентрацию для левого сосуда на 9 mM и нажать кнопку «Распределение» (**Dispense**).
3. Заполнить правый сосуд дистиллированной водой (**Deionizer Water**) и нажать кнопку «Распределение» (**Dispense**)..
4. Установить таймер времени на 60 минут.
5. Нажать кнопку «Старт» для начала эксперимента. Обратите внимание на индикаторы «Давление» (**Pressure**) над каждым сосудом.

6. Когда время эксперимента закончится, нажмите кнопку «Зарегистрировать результат» (**Record date**). Данные перенесите в таблицу №3,
7. Нажмите кнопку «Промывка» (**Flush**) под каждым сосудом, чтобы опорожнить их.
8. Верните мембрану на прежнее место.
9. Повторите эксперимент, используя оставшиеся три мембраны. Зарегистрируйте все результаты, промывая сосуды после каждого эксперимента.

1. Наблюдали ли вы изменения давления во время эксперимента? Если это было, то в каком (каких) сосуде (сосудах) и с какой (какими) мембраной?

2. Почему?

3. Диффундирует ли Na^+/Cl^- из левого сосуда в правый сосуд? Если да, то с какой мембраной (MWCO)?

4. Почему?

10. Повторите эксперимент, используя 9 mM альбумина в левом сосуде, затем 9 mM глюкозы. Заносите данные «Зарегистрировать результат» (**Record date**) после каждой серии эксперимента в таблицу №3.

Таблица №3.

Результаты осмоса						
Растворенное вещество (solute)	Мембрана (MWCO)	Стартовая концентрация слева Start conc. L.	Давление слева Press L	Стартовая концентрация справа Start conc. R	Давление справа Press R	Скорость перехода вещества Rate
Na^+/Cl^-						
Альбумин						
Глюкоза						

11. Нажмите кнопку «Инструменты» (**Tools**) — «Распечатать результат» (**Print date**), распечатайте результаты.

1. Объясните взаимоотношения между концентрацией растворенного вещества и осмотическим давлением.

2. Позволяет ли диффузия генерироваться осмотическому давлению?

3. Должно ли давление генерироваться, если концентрация растворенного вещества будет равной на противоположных сторонах мембраны?

4. Почему да, или почему нет?

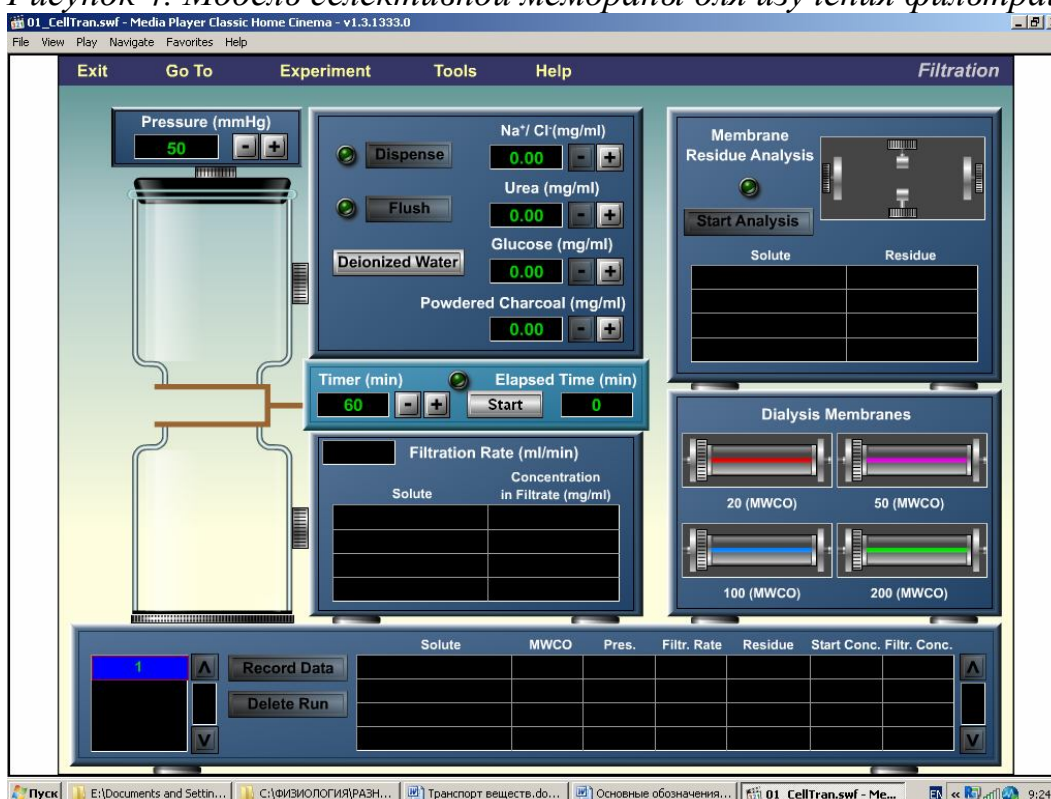
5. Должно ли давление создаваться, если вы установили 9 mM глюкозы с одной стороны 200 MWCO мембраны и 9 mM NaCl с другой стороны? Какой раствор генерировал давление
6. Должно ли давление формироваться, если вы установили 9 mM альбумина на одной стороне 200 MWCO мембраны и 9 mM NaCl с другой стороны?
7. Какой раствор генерировал давление?

Работа №5

ФИЛЬТРАЦИЯ

Нажмите на кнопку «Эксперимент» на верхней панели экрана и выберите раздел «Фильтрация» (**Filtration**). Вы видите открывшийся экран, на котором имеются заметные отличия от ранее выполненных работ (рис. 4).

Рисунок 4. Модель селективной мембраны для изучения фильтрации



Заметим, что два сосуда расположены на левой стороне экрана, один над другим. Верхний сосуд содержит шкалу давления.

В отличие от эксперимента по осмосу, в котором шкала давления определяет давление, которое развивается вследствие движения воды, эта шкала давления измеряет гидростатическое давление, которое будет фильтровать жидкость из верхнего сосуда в нижний. Экран «Анализ мембранного остатка» (**Membrane residue analysis**) будет использован для определения, если какое-либо вещество остается на мембране после каждой серии экспериментов.

Ход работы:

1. Нажмите кнопку «мышки» и переместите 20 MWCO мембрану в мембранный держатель между двумя сосудами.
2. Установите Na^+/Cl^- на 9 тМ, мочевины и глюкозу на 5 тМ и насыпьте «Древесный уголь» (**Powdered Charcoal**) 5мг/мл, нажав кнопку (+), расположенную после кнопок для растворенных веществ. Затем нажмите кнопку «Распределение» (**Dispense**) рядом с верхним сосудом.
3. Установите давление на 50 мм.рт.ст. и таймер времени на 60 минутах. Нажмите кнопку «Старт». Вы можете наблюдать, что жидкость начала фильтроваться в нижний сосуд.
4. Включите устройство фильтрационного анализа (**Filtration Rate**) (рядом с нижним сосудом), это дает вам возможность следить за тем, какое растворенное вещество проходит через мембрану.
5. По истечении 60 минут переместите мембрану к устройству анализа мембранного остатка и опустите ее с помощью «мышки». Мембрана окажется замкнутой на месте. Нажмите кнопку «Начало анализа» (**Start analysis**). На табло результатов, внизу, вы увидите, какие растворенные вещества определяются на мембране, используемой для фильтрации.
6. Зарегистрируйте результаты, нажимая кнопку «Зарегистрировать результат» (**Record data**).

Каковы результаты вашего исходного анализа?

7. Нажмите кнопку «Промывка» (**Flush**) и верните мембрану в исходное положение.
8. Установите 50 MWCO мембрану в мембранный держатель между сосудами.
9. Оставьте давление на 50 и повторите эксперимент. Когда таймер времени достигнет 60 минут, выполните мембранный анализ и зарегистрируйте результаты.
10. Нажмите кнопку «Промывка» (**Flush**) и верните мембрану.
11. Повторите этапы 8-10 с оставшимися двумя мембранами. Регистрируйте результаты для каждой серии экспериментов.
12. Увеличьте давление до 100 мм.рт.ст. и повторите полностью эксперимент. Снова зарегистрируйте результаты.
13. Нажмите кнопку «Инструменты — Распечатать результат» (Tools – Print data).

Влияет ли MWCO мембраны на скорость фильтрации?

Влияет ли величина прикладываемого давления на уровень фильтрации?

Все ли растворенные вещества проходят через все мембраны?

Какие вещества не могут сделать этого? Почему?

Как может организм селективно увеличивать уровень фильтрации данного органа или системы?

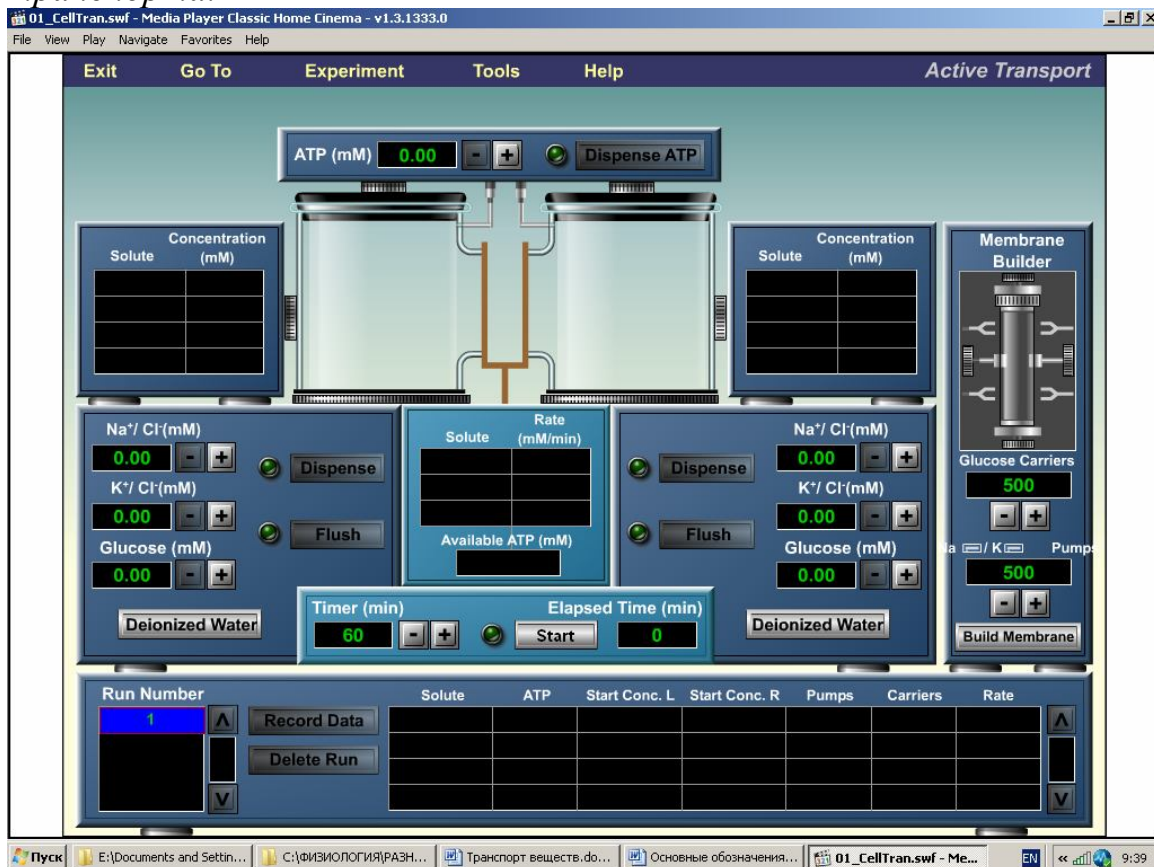
Работа №6.

АКТИВНЫЙ ТРАНСПОРТ

Нажмите кнопку «Эксперимент» на верхней панели экрана и выберите работу «Активный транспорт» (**Active Transport**).

Новый экран, который появится, сходен с экраном работы по облегченной диффузии (рис. 5).

Рисунок 4. Модель селективной мембраны для изучения активного транспорта.



Основным отличием является добавление АТФ-распределителя над сосудами. Напомним, что АТФ необходима для систем с активным транспортом и должна добавляться для каждой серии эксперимента.

Ход работы:

1. Убедитесь, что в мембранном строителе число глюкозных переносчиков установлено на 500, а номер Na^+/Cl^- насосов установлен также на 500.
2. Нажмите кнопку «Построить мембрану» (**Build membrane**).
3. Переместите построенную мембрану к мембранному держателю между двумя сосудами.

4. Для левого сосуда установите Na^+/Cl^- на 9 mM, щелкнув кнопку (+), и нажмите кнопку «Распределение» (**Dispense**).
5. Для правого сосуда нажмите кнопку «Дистиллированная вода» (**Deionizer Water**) и затем кнопку «Распределение» (**Dispense**).
6. Установите АТФ на 1 mM и нажмите кнопку «Распределить АТФ» (**Dispense ATP**).
7. Установите таймер времени на 60 минут и затем включите «Старт» (**Start**).

В конце этой экспериментальной серии определите, передвигается ли Na^+/Cl^- из левого сосуда в правый. Почему?

8. Нажмите кнопку «Промывка» (**Flush**) под обоими сосудами.
9. Добавьте 9 mM NaCl к левому сосуду и 9 mM KCl - к правому сосуду. Нажмите кнопку «Распределение» (**Dispense**).
10. Установите АТФ на 1 mM, нажмите кнопку «Распределение АТФ» (**Dispense ATP**) и затем кнопку «Старт».
11. В конце эксперимента нажмите кнопку «Зарегистрировать результат».

Концентрации растворенных веществ будут изменяться в окнах рядом с обоими сосудами. Скорость будет медленно снижаться, затем остановится до завершения серии. Почему?

12. Повторите эксперимент, увеличивая количества АТФ, добавленного к системе.

Изменится ли количество транспортируемого NaCl/KCl?

13. Повторите эксперимент, используя изменения числа переносчиков и насосов, когда вы строите мембрану.

Изменится ли количество растворенных веществ, транспортируемых через

мембрану, с увеличением числа переносчиков и насосов?

Является ли одно растворенное вещество более эффективным, чем другие?

Влияет ли мембрана, которую вы «строите», на простую диффузию?

Если вы помещаете 9 mM NaCl с одной стороны мембраны и 15 mM с другой

стороны, будет ли передвижение NaCl? Почему?

Вызывает ли количество добавленного АТФ какое-либо изменение?

14. Нажмите кнопку «Инструменты — Распечатать данные», для регистрации результатов.

15. Заполните протокол опытов, составив следующую таблицу.

Табл 4.

Раствор solute	АТФ ATP	Стартовая концентрация слева Start conc. L	Стартовая концентрация справа Start conc. R	Давление Pumps	Размер пор Carriers	Результат фильтрации Rate