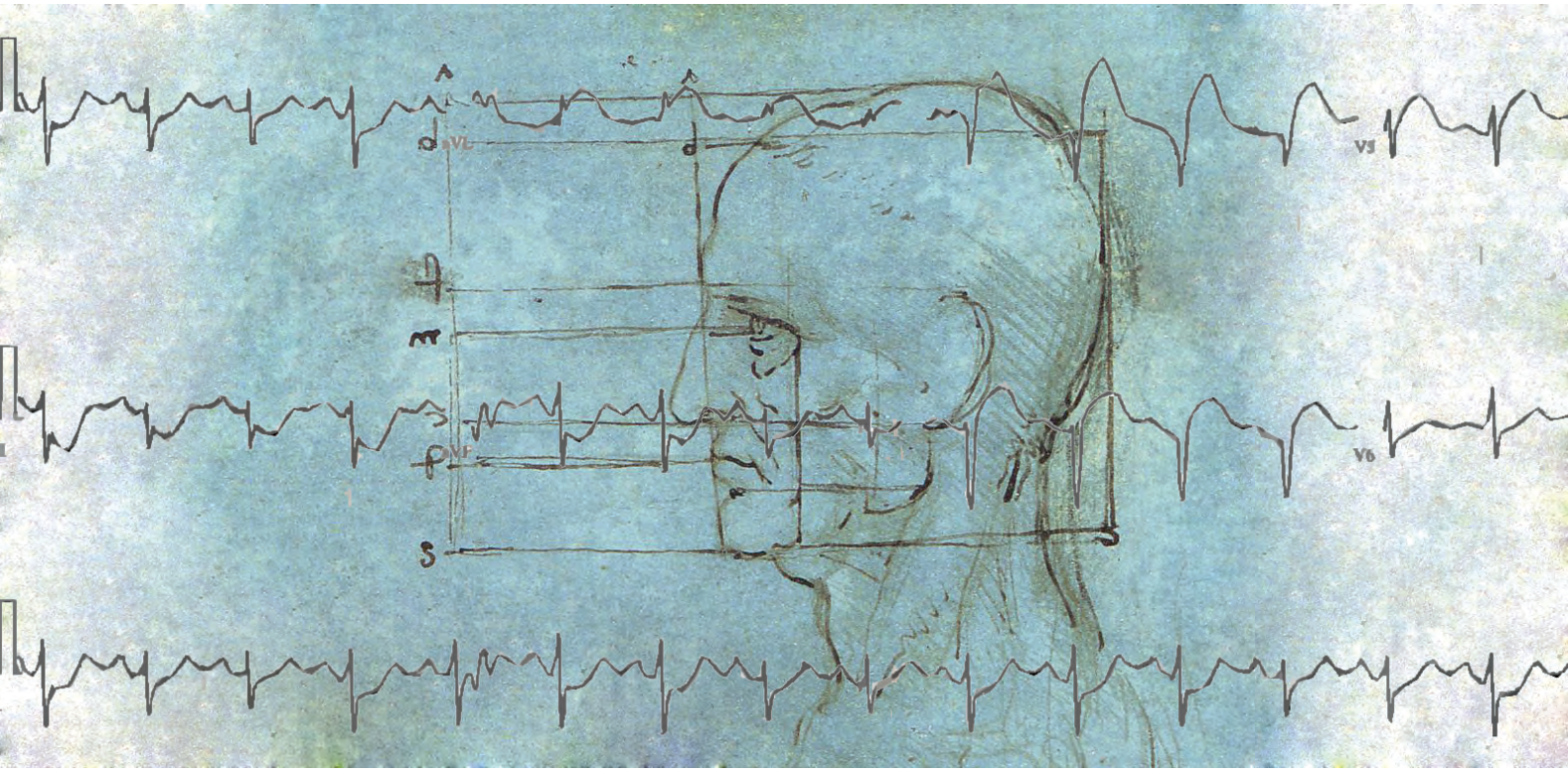


Biofizyka układów biologicznych

wykład

Justyna Strankowska

Gdańsk, 2013

Wydział Matematyki, Fizyki i Informatyki
Uniwersytetu Gdańskiego

Skrypt powstał w ramach projektu „Kształcimy profesjonalistów – kompleksowy program kształcenia skierowany do studentów, absolwentów oraz studentów niepełnosprawnych Uniwersytetu Gdańskiego” współfinansowanego przez Unię Europejską w ramach środków Europejskiego Funduszu Społecznego.

KAPITAŁ LUDZKI
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI

UNIWERSYTET GDAŃSKI

UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI
FUNDUSZ SPOŁECZNY

Spis treści

Rozdział 1 Wstęp do opisu materii ożywionej 7

1.1 Charakterystyka układów biologicznych 7

1.2 Oddziaływania w układach biologicznych 8

1.2.1 Oddziaływania wewnątrzcząsteczkowe 9

Wiązanie kowalencyjne (atomowe, homeopolarne) 9

Wiązanie kowalencyjne spolaryzowane 10

Wiązanie jonowe 10

Wiązanie koordynacyjne 11

1.2.2 Oddziaływania międzycząsteczkowe 13

Oddziaływania van der Waalsa 13

Wiązanie wodorowe 14

Oddziaływanie z przeniesieniem ładunku 15

1.2.3 Oddziaływania strukturalne 15

Oddziaływanie hydrofobowe 15

Oddziaływania warstwowe 15

1.2.4 Międzycząsteczkowe oddziaływania van der Waalsa 16

Rozdział 2 Elementy biofizyki molekularnej 19

2.1 Makrocząsteczki biologiczne 19

2.1.1 Białka 26

2.1.2 Kwasy nukleinowe 31

2.1.3 Polisacharydy 34

2.1.4 Lipidy 36

Błony biologiczne 39

Literatura 42

Rozdział 3 Biofizyka komórki 45

3.1 Czynność elektryczna błony komórkowej 45

3.1.1 Potencjał spoczynkowy 46

3.1.2 Potencjał czynnościowy błony 51

3.2 Rejestracja sygnałów elektrycznych 53

Literatura 55

Rozdział 4 Biofizyka tkanek 57

4.1 Tkanka nerwowa 57

4.2 Tkanka mięśniowa 61

4.2.1 Komórka mięśniowa poprzecznie prążkowana 62

4.2.2 Komórka mięśniowa gładka 70

4.2.3 Mięsień sercowy 71

4.3 Tkanka łączna 74

Literatura 78

Rozdział 5 Biofizyka narządów 79

5.1 Biofizyka układu krążenia 79

5.1.1 Opór naczyniowy przepływu krwi 80

5.1.2 Sprężyste właściwości naczyń krwionośnych 83

5.1.3 Fala tętna 86

5.1.4 Energetyka serca 88

5.2 Biofizyka układu oddechowego 91

5.2.1 Proces wentylacji płuc 91

5.2.2 Właściwości mechaniczne tkanki płucnej 93

5.2.3 Praca i moc oddechowa 95

5.2.4 Wymiana gazowa 97

Literatura 98

Rozdział 6 Metody badawcze wykorzystywane do badań układów biologicznych 101

6.1 Rentgenografia 101

6.1.1 Rozpraszanie promieniowania rentgenowskiego 101

6.1.2 Wytwarzanie promieniowania rentgenowskiego 103

6.1.3 Metody badań rentgenowskich 109

Metoda obracanego kryształu 110

Metoda Debay'a–Scherera–Hulla (DSH) 112

Metoda czasu przelotu 112

6.1.4 Rozpraszanie małokątowe (SAXS - Small Angle X-Ray Scattering) 112

6.2 Spektroskopia Ramana i spektroskopia w podczerwieni 114

6.2.1 Teoria drgań oscylacyjnych 114

6.2.2 Spektroskopia absorpcyjna w podczerwieni 120

6.2.3 Spektroskopia Ramana 124

6.3 Spektroskopia UV-VIS 128

6.4 Metody Magnetycznego Rezonansu Jądrowego 132

6.4.1 Podstawy zjawiska Magnetycznego Rezonansu Jądrowego 132

Literatura 146

Wstęp

Biofizyka to dział nauki obejmujący zagadnienia z zakresu fizyki, biologii i chemii. Stanowi zatem rozległy obszar poszukiwania odpowiedzi na pytania jak są zbudowane i jak funkcjonują układy biologiczne oraz za pomocą jakich narzędzi – metod badawczych można je badać. To dzięki biofizyce piękny, fascynujący, zaskakujący i nieodkryty do końca temat „Życie" nabiera barw, brzmi wśród sygnałów akustycznych, odpowiada na bodźce, zmienia się i organizuje, myśli i przetwarza, wykonuje pracę i dyssypuje energię…

Niniejszy skrypt powstał w oparciu o wykład „*Biofizyka układów biologicznych*" prowadzony przeze mnie dla studentów kierunku Fizyka medyczna na Wydziale Matematyki, Fizyki i Informatyki Uniwersytetu Gdańskiego. Opracowanie to zostało napisane na podstawie aktualnej literatury z zakresu biofizyki, fizyki miękkiej materii oraz metod badawczych wykorzystywanych w badaniach układów biologicznych. Skrypt obejmuje zagadnienia dotyczące budowy i właściwości fizycznych materii ożywionej, opisuje z fizycznego punktu widzenia procesy charakterystyczne dla komórek, tkanek i narządów. Ostatni rozdział skryptu poświęcony jest metodom badania układów biologicznych.

Skrypt ten powstał w ramach realizowanego na Wydziale projektu „Kształcimy profesjonalistów – kompleksowy program kształcenia skierowany do studentów, absolwentów oraz studentów niepełnosprawnych Uniwersytetu Gdańskiego" współfinansowanego przez Unię Europejską w ramach środków Europejskiego Funduszu Społecznego.

Justyna Strankowska

Gdańsk, czerwiec 2013

Rozdział 1 Wstęp do opisu materii ożywionej

1.1 Charakterystyka układów biologicznych

W 1991 roku Pierre Gilles de Gennes (1932-2007) otrzymał Nagrodę Nobla z fizyki *„for discovering that methods developed for studying order phenomena in simple systems can be generalized to more complex forms of matter, in particular to liquid crystals and polymers"* [1], wprowadzając nową dziedzinę nauki – miękką materię (*Soft Matter*). Do miękkiej materii zalicza się polimery, makromolekuły biologiczne, błony biologiczne, układy amfifilowe, ciekłe kryształy, koloidy, żele, gumy, czyli wszystkie takie materiały, których nie można jednoznacznie zaklasyfikować jako proste płyny lub ciała stałe. Często układy tego typu nazywa się również płynami złożonymi (*complex fluids*). Termin „soft" (*miękka*) wywodzi się z makroskopowych, mechanicznych właściwości materii, która łatwo ulega deformacji. Obserwowane moduły Younga są dla takich materiałów o nawet kilka rzędów wielkości mniejsze niż te obserwowane dla ciał stałych (np. ciekłe kryształy). Dzięki temu możliwy jest transport erytrocytów o średnicy kilku mikrometrów przez kanały błonowe o wielkości nawet 10 razy mniejszej niż one same. Jest to materia o tak zwanej strukturze mezoskopowej (pomiędzy makro a mikro skalą), w której obserwuje się uporządkowanie w zakresie od 1 do 1000 nm, czyli w nanoskali. Charakteryzująca się częściowym uporządkowaniem orientacyjnym i/lub translacyjnym w związku z możliwością formowania się mezofaz (*mezo* $\rightarrow$ *pomiędzy*) w układach tego typu. Stopień uporządkowania materii miękkiej znajduje się między krystalicznym ciałem stałym a cieczą. Porządkowanie się układów należących do miękkiej materii wiąże się ze spontanicznym łamaniem symetrii układu, powstają wówczas struktury o niższej symetrii. Miękka materia charakteryzuje się złożonością tworzonych struktur hierarchicznych. W temperaturach poniżej 273K miękka materia zestala się (w związku z obecnością w jej strukturze cząsteczek wody), a powyżej 300-400K ulega chemicznej degradacji.

Wyróżnia się pięć charakterystycznych cech opisujących układy należące do miękkiej materii:

- czułość: układ bardzo silnie reaguje na słabe zmiany warunków zewnętrznych;
- nieliniowość: układ odpowiada na zaburzenia zewnętrzne w sposób silnie nieliniowy;
- uniwersalność: mezoskopowe skale przestrzenne warunkują uniwersalność ogólnych modeli opisu;

- przypadkowość: miękka materia jest w stanie ciągłego ruchu przypadkowego (fluktuacje termiczne);
- samoorganizacja: mobilność termiczna w połączeniu z dążeniem układu do równowagi termodynamicznej daje bogactwo różnych faz i struktur hierarchicznych.

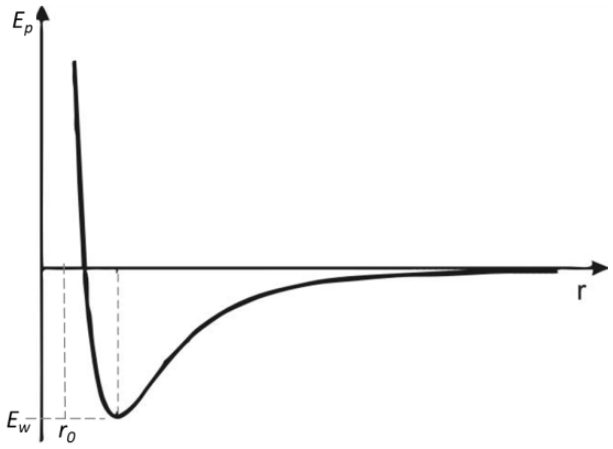
Miękką materię charakteryzuje złożoność zarówno struktury jaki i dynamiki. Teorie dotyczące opisu zjawisk fizycznych obserwowanych w takich układach są zatem skomplikowane i w większości przypadków nie pozwalają uzyskać wyników ilościowych. Do opisu materii miękkiej najczęściej używa się fizyki statystycznej, mechaniki i elektrodynamiki ośrodków ciągłych, teorii procesów stochastycznych i metod kwantowej teorii pola. W najprostszy sposób można jednak opisać procesy zachodzące w układach tego typu za pomocą praw skalowania. Za ich pomocą można określić w jaki sposób jedna zmienna zależy od innej zmiennej, przy założeniu, że pozostałe wielkości fizyczne są stałe. Prawa te dobrze sprawdzają się w przypadku opisu roztworów polimerów, czy badaniu oddziaływań międzycząsteczkowych. Najprostszą postacią prawa skalowania jest prawo potęgowe postaci:

$$x \sim y^z,$$

gdzie zmienna *x* jest skalowana zmienną *y* w potędze *z*.

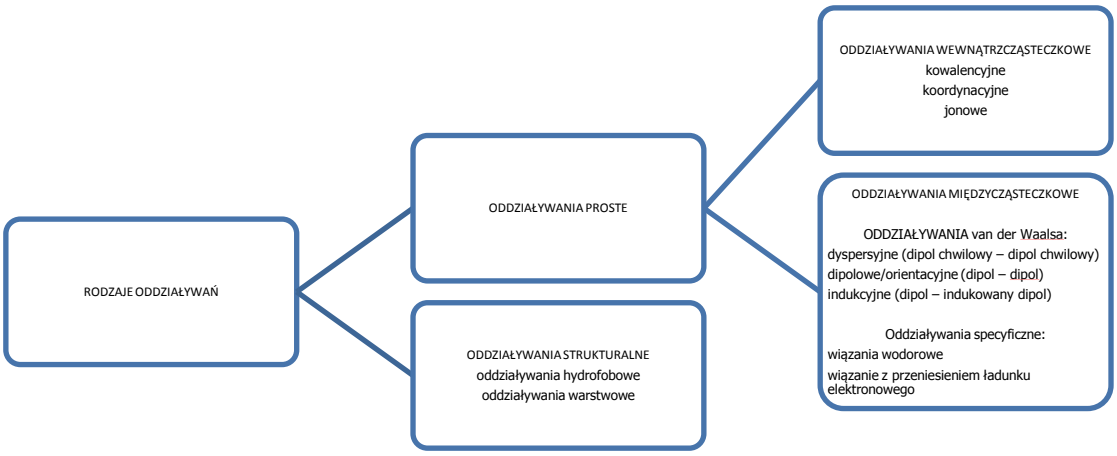
1.2 Oddziaływania w układach biologicznych

Kluczową rolę w powstawaniu układów biologicznych odgrywają oddziaływania wewnątrz i międzycząsteczkowe. Oddziaływania wewnątrzcząsteczkowe umożliwiają powstawanie cząsteczek z atomów, które łączą się ze sobą wtedy, gdy energia powstałej cząsteczki jest mniejsza od sumy swobodnych atomów. Układ taki posiada wówczas minimalną wartość energii potencjalnej. Zmiany energii potencjalnej w funkcji odległości *r* między atomami tworzącymi cząsteczkę przedstawiono na rysunku 1.1. Minimum energii uzyskuje się dla *r* równego długości wiązania r_0. Oddziaływania międzycząsteczkowe odpowiedzialne są za tworzenie bardziej skomplikowanych struktur hierarchicznych. Właściwości materii takie jak: stan skupienia, temperatury przemian fazowych, rozpuszczalność, adsorpcja, zależą od składu chemicznego, budowy cząsteczek – wiązań wewnątrzcząsteczkowych oraz oddziaływań międzycząsteczkowych.



Rys. 1.1. Zależność energii potencjalnej E_p układu dwóch atomów od odległości r między nimi (E_w – energia wiązania, r_0 – długość wiązania).

Oddziaływania w układach biologicznych można podzielić na proste oraz strukturalne (Schemat 1.1.). Do oddziaływań prostych zalicza się oddziaływania wewnątrzcząsteczkowe oraz międzycząsteczkowe. Zastępują je oddziaływania strukturalne w skali mezoskopowej, gdyż zależą one od utworzonej lokalnej struktury układu.



Schemat 1.1. Rodzaje oddziaływań w układach biologicznych.

1.2.1 Oddziaływania wewnątrzcząsteczkowe

Wiązanie kowalencyjne (atomowe, homeopolarne)

Wiązanie kowalencyjne powstaje między atomami pierwiastków o zbliżonej elektroujemności. Tworzy je para utworzona przez dwa elektrony pochodzące po jednym z każdego z dwóch atomów połączonych tym wiązaniem. Wiązania między tymi samymi

atomami są niepolarne, gdy występuje pewna różnica elektroujemności, powstaje wiązanie kowalencyjne spolaryzowane.

Przykłady wiązań kowalencyjnych: $H_2, O_2, N_2, Cl_2, HF, CH_4, NH_3$.

Wiązanie kowalencyjne spolaryzowane

Wiązanie kowalencyjne spolaryzowane powstaje wówczas, gdy wspólna para elektronowa jest silniej przyciągana przez jedno z jąder. Prowadzi to do asymetrycznego oddziaływania jąder, a więc do niesymetrycznego rozkładu ładunku pochodzącego od wspólnych elektronów. Zjawisko to nazywa się polaryzacją. Ładunek ujemny „zagęszcza się" przy bardziej elektroujemnym atomie, natomiast rozrzedzenie chmury elektronowej obserwuje się z drugiej strony cząsteczki. Wiązanie wówczas ma charakter biegunowy: jeden biegun cząsteczki wykazuje cząstkowy ładunek ujemny, a drugi dodatni. Cząsteczka o dwóch biegunach nazywana jest cząsteczką polarną lub dipolową. Miarą polarności wiązań jest moment dipolowy $\boldsymbol{\mu}$. Moment dipolowy jest wielkością wektorową o kierunku zgodnym z osią łączącą jądra w cząsteczce, zwrocie od ładunku ujemnego do dodatniego i wartości równej iloczynowi ładunku q i odległości między ładunkami l:

$$\boldsymbol{\mu} = q\mathbf{l}$$

Moment dipolowy cząsteczki wieloatomowej stanowi sumę wektorową momentów dipolowych poszczególnych wiązań.

Wiązanie jonowe

Wiązanie jonowe występuje wtedy, gdy obojętny elektrycznie atom oddaje elektron innemu elektrycznie obojętnemu atomowi, powstają wówczas jony, które przyciągają się siłami elektrycznymi. Przeniesienie elektronu występuje od atomu o mniejszej elektroujemności do atomu o większej elektroujemności. Atomy jednego pierwiastka tracą elektrony i stają się jonami dodatnimi (kationami), a atomy drugiego pierwiastka przyjmując te elektrony stają się jonami ujemnymi (anionami). Oddziaływania elektrostatyczne między różnoimiennie naładowanymi jonami prowadzą do utworzenia uporządkowanej struktury przeciwnie naładowanych jonów tzw. sieci krystalicznej.

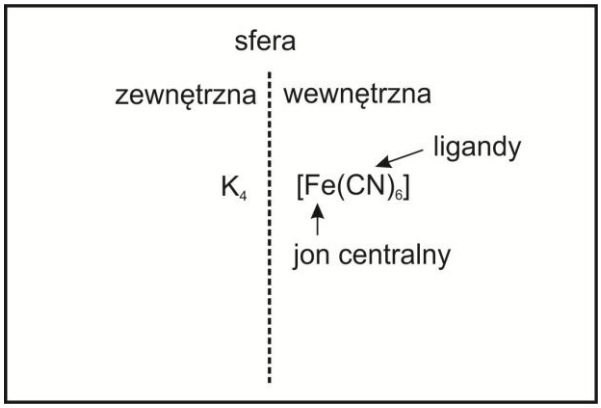
Wiązanie koordynacyjne

W wiązaniu koordynacyjnym wiążąca atomy para elektronów pochodzi tylko od jednego atomu, a drugi atom daje tylko dla tych par niewypełnione orbitale. Atom, który dostarcza parę elektronową nazywany jest donorem – „lubi jądro", a atom przyjmujący elektrony akceptorem – „lubi elektrony". Warunki tworzenia wiązania koordynacyjnego są następujące:

- skłonność akceptora do przyjęcia pary elektronowej;
- słabe związanie par elektronowych w donorze, by mogły ulegać przesunięciu.

Przykładami cząsteczek, w których występuje wiązanie koordynacyjne są: $NH_4^+, H_3O^+, SO_3, P_2O_5, H_2SO_4$ oraz związki kompleksowe. Związki kompleksowe zbudowane z dwóch sfer koordynacyjnych (rys. 1.2.):

- wewnętrznej zwanej jonem kompleksowym (jon centralny + ligandy);
- zewnętrznej (proste jony przeciwnego znaku np. K^+).



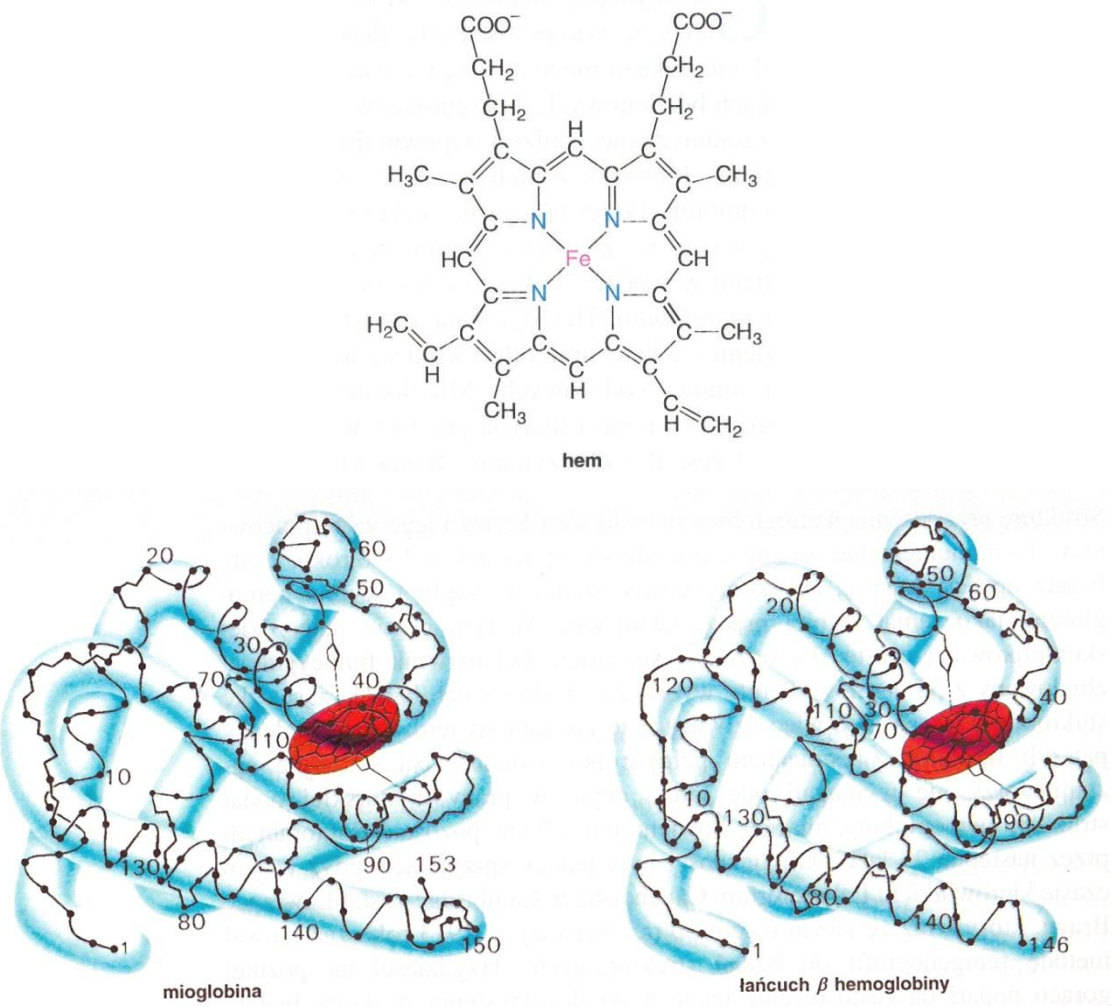
Rys. 1.2. Budowa związku kompleksowego.

Jonem centralnym są zwykle kationy – jony pierwiastków o niecałkowicie zapełnionych elektronami podpowłokach *p* lub *d* (żelazo, kobalt, nikiel, mangan). Ligandami natomiast są skoordynowane z atomem centralnym podstawniki (atomy, dipole, jony) otaczające atomy centralne i dostarczające przynajmniej jedną parę elektronową, połączone z jonem centralnym wiązaniem koordynacyjnym lub oddziaływaniem elektrostatycznym (azot, tlen, siarka, węgiel).

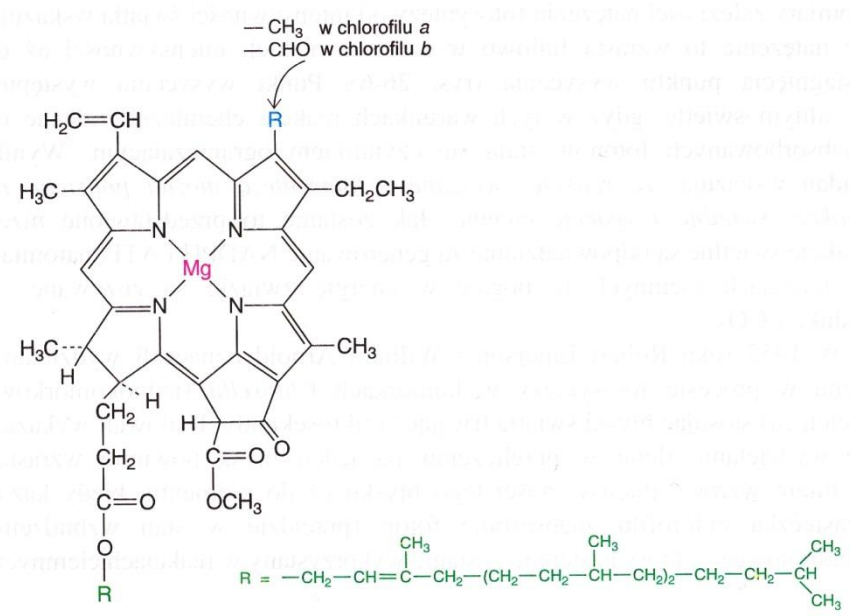
Związkami kompleksowymi ważnymi z punktu widzenia biologicznego są:

- kompleks żelazo-porfirynowy obecny w hemie hemoglobiny i mioglobiny (rys. 1.3.);
- kompleks magnezo-porfirynowy w cząsteczce chlorofilu (rys.1.4.);

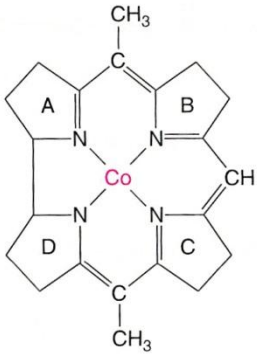
– kompleks kobalto-porfirynowy w cząsteczce witaminy B12 (rys. 1.5.).



Rys. 1.3. Kompleks żelazo-porfirynowy [7].



Rys. 1.4. Kompleks magnezo-porfirynowy [7].



Rys. 1.5. Kompleks kobalto-porfirynowy [7].

1.2.2 Oddziaływania międzycząsteczkowe

Oddziaływania międzycząsteczkowe występują pomiędzy atomami należącymi do oddzielnych cząsteczek. Są to oddziaływania słabe, w porównaniu do wiązań chemicznych wiążących trwale atomy w cząsteczce. Są one również nietrwałe, gdyż powodują powstanie przejściowych połączeń między różnymi cząsteczkami.

Oddziaływania van der Waalsa

Siły oddziaływania między atomami należącymi do sąsiednich cząsteczek nazywa się siłami van der Waalsa. Oddziaływania van der Waalsa są oddziaływaniami typu elektrostatycznego. Powstają na skutek zmian w rozmieszczeniu ładunku w powłokach elektronowych zbliżających się do siebie atomów – atomy wzajemnie indukują momenty dipolowe, które są źródłem przyciągania między nimi. Siła tego oddziaływania zależy od polarności układu, czyli od rozkładu i wielkości ładunku elektrycznego w cząsteczce. Do oddziaływań van der Waalsa zalicza się:

- efekt dyspersyjny – oddziaływania typu dipol chwilowy – dipol chwilowy (siły dyspersyjne);
- efekt indukcyjny – oddziaływania typu dipol-dipol indukowany i jon-dipol indukowany;
- efekt orientacyjny – oddziaływania typu dipol-dipol i jon-dipol.

Efekt dyspersyjny obserwuje się wtedy, gdy w cząsteczkach niepolarnych ruch elektronów wokół jądra powoduje deformację powłok elektronowych. W wyniku tego procesu powstają dipole przejściowe, których obecność powoduje powstanie dipoli przejściowych w sąsiednich atomach. Oddziaływania między takimi dipolami zwane są siłami

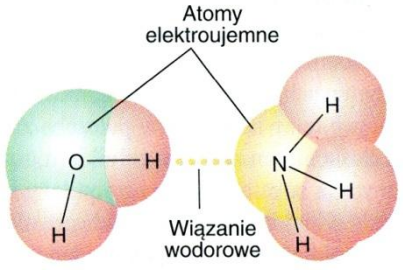
dyspersyjnymi i są najefektywniejsze do 0,5 nm ($V = - C/r^6$). Odległość na jaką mogą się zbliżyć dwie cząsteczki nazywa się promieniem van der Waalsa.

Efekt indukcyjny występuje wówczas, gdy cząsteczki polarne indukują powstawanie dipoli w sąsiednich cząsteczkach niepolarnych. Dipole przyciągają się na skutek oddziaływania indukowanego momentu dipolowego z trwałym momentem dipolowym $V = - C/r^6$. Istotą tego oddziaływania jest polaryzacja, czyli rozsunięcie ładunku w cząsteczkach niepolarnych. W wyniku tego, spolaryzowane atomy lub cząsteczki przyciągają się.

Efekt orientacyjny występuje między cząsteczkami posiadającymi trwałe momenty dipolowe. Oddziaływania tego typu prowadzą do wzajemnego przyciągania się jonów i dipoli. Występuje przy tym tzw. efekt kierunkowy – wzajemne przyciąganie się występuje tylko w przypadku odpowiednio zorientowanych względem siebie jonów i dipoli w przestrzeni. Efekt ten silnie zależy od temperatury, gdyż ruch cieplny cząsteczek przeciwdziała uporządkowanemu ustawieniu dipoli. Siła przyciągania orientacyjnego równa się iloczynowi momentów dipolowych podzielonemu przez r^4.

Wiązanie wodorowe

Wiązanie wodorowe zalicza się do oddziaływań typu elektrostatycznego o charakterze kierunkowym (wzdłuż wiązania chemicznego pomiędzy atomem elektroujemnym i wodorem). Powstaje w wyniku utworzenia połączenia między pierwiastkami (A, B) silnie elektroujemnymi (np. O, N, F, Cl, S) poprzez atom wodoru. Przykładowe wiązanie wodorowe utworzone między atomem azotu cząsteczki amoniaku a atomem wodoru cząsteczki wody przedstawia rysunek 1.6. Atom wodoru połączony jest w takich układach kowalencyjnie z jednym z silnie elektroujemnych atomów. Za pomocą wiązania wodorowego połączone mogą być oddzielne molekuły (międzymolekularne wiązanie wodorowe) lub grupy atomów w obrębie tej samej molekuły (wewnątrzmolekularne wiązanie wodorowe).



Rys.1.6. Wiązanie wodorowe
między atomem azotu cząsteczki amoniaku a atomem wodoru cząsteczki wody [8].

Oddziaływanie z przeniesieniem ładunku

Oddziaływania tego typu występują w związkach organicznych i kompleksowych. Oddziaływanie to polega na międzycząsteczkowym przeniesieniu ładunku elektronowego z jednej cząsteczki (donor) do innej (akceptor) lub z grupy donorowej do akceptorowej w obrębie tej samej cząsteczki (przeniesienie wewnątrzcząsteczkowe). Występuje wówczas częściowe przeniesienie chmury elektronowej od donora do akceptora podczas przejścia ze stanu podstawowego do wzbudzonego na skutek absorpcji światła (elektron jednej molekuły zajmuje pusty orbital drugiej molekuły). Molekuła po wyemitowaniu pochłoniętego fotonu światła wraca do stanu podstawowego.

1.2.3 **Oddziaływania strukturalne**

Oddziaływanie hydrofobowe

Oddziaływania hydrofobowe dotyczą nierozpuszczalnych w wodzie cząsteczek niepolarnych (hydrofobowość), które nie zawierają spolaryzowanych wiązań ani atomów. W środowisku wodnym wykazują one tendencję do łączenia się, czyli agregacji za którą odpowiedzialne są oddziaływania hydrofobowe). W środowisku wodnym oddziaływanie z polarnymi cząsteczkami H_2O doprowadzi do takiego układu, w którym fragmenty hydrofobowe cząsteczki „unikają" kontaktu z wodą grupując się razem, natomiast części hydrofilowe „chętnie" będą z nią oddziaływać. Zaburzenie lokalnej struktury wiązań wodorowych w wodzie na skutek obecności cząsteczek niepolarnych powoduje zmniejszenie się entropii układu, czyli zwiększenie uporządkowania poprzez obecność „obcych" molekuł, co skutkuje wzrostem energii swobodnej układu, Jest to tak zwany efekt entropowy. Agregacja cząsteczek niepolarnych powoduje zmniejszenie stopnia uporządkowania wody.

Oddziaływania warstwowe

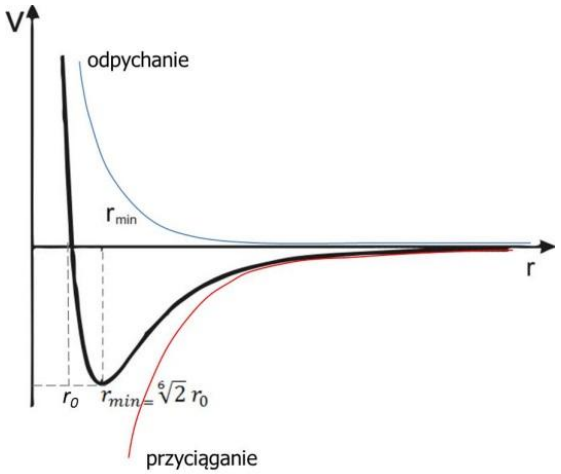
Oddziaływania warstwowe występują między płaskimi fragmentami cząsteczek chemicznych (DNA, RNA) i decydują o stabilności tworzonych przez nie struktur. Oddziaływanie to opiera się na trzech oddziaływaniach fizycznych: elektrostatycznym, hydrofobowym, van der Waalsa.

1.2.4 **Międzycząsteczkowe oddziaływania van der Waalsa**

Między cząsteczkami mogą występować dwa rodzaje sił: krótkozasiegowe siły odpychające oraz długozasiegowe siły przyciągające. Energia takiego oddziaływania jest opisywana za pomocą potencjału Lenarda-Jonesa, który uwzględnia przyciągające oraz odpychające właściwości materii. Potencjał takiego oddziaływania można zapisać ogólnej postaci: $V = C_n/r^n - C_m/r^m$, gdzie $n>m$, człony C_n/r^n oraz C_m/r^m odpowiadają odpowiednio oddziaływaniom odpychającym i przyciągającym. Jeżeli $n = 12$, $m = 6$, to mamy do czynienia z potencjałem Lenarda-Jonesa postaci:

$$V(r) = 4\varepsilon\left[\left(\frac{r_0}{r}\right)^{12} - \left(\frac{r_0}{r}\right)^{6}\right],$$

gdzie pierwszy człon w nawiasie dotyczy oddziaływania odpychającego, a drugi przyciągającego, a ε jest głębokością studni potencjału. Potencjał ten silnie zależy od odległości między atomami (rys. 1.7.).



Rys. 1.7. Potencjał Lenarda-Jonesa.

Rozpatrywany w skali mikroskopowej opis oddziaływań van der Waalsa występujących między atomami można uogólnić na opis tych oddziaływań występujących między cząsteczkami (w skali makroskopowej), zakładając, że siły van der Waalsa nie maleją wraz z odległością. Przyjmując dodatkowo następujące założenia, addytywność oddziaływań dwóch izolowanych cząstek oraz kontinuum materii ze średnią ilością molekuł na jednostkę objętości, ρ = const. [m^{-3}],

energia oddziaływania dwóch makroskopowych ciał o gęstości ρ_1 i ρ_2, zajmujących objętość V_1 i V_2 wynosi:

$$V = -\int_{V_1} \mathrm{d}V_1 \int_{V_2} \mathrm{d}V_2 \frac{\rho_1\rho_2 C_{12}}{|r_1 - r_2|^6},$$

gdzie $|r_1\text{-}r_2|$ jest odległością między elementami objętości dV_1 i dV_2, C_{12} jest stałą, która zależny od parametrów molekularnych (np. od polaryzowalności), nie zależy natomiast od geometrii ciała. Energię tego oddziaływania można również zapisać w postaci:

$$V = -\frac{A_{12}}{\pi^2}\int_{V_1}\int_{V_2}\frac{dV_1 dV_2}{|r_1 - r_2|^6},$$

gdzie iloczyn $\rho_1\rho_2 C_{12}$ jest materiałową stałą Hamakera, która wynosi 4,4 × 10^{-19} J dla fazy skondensowanej.

Konsekwencją zależności potęgowej (-6) potencjału od odległości jest to, że energia oddziaływania dwóch ciał pozostaje stała, gdy wszystkie odległości (wielkość i odległość dwóch ciał) są skalowane przez ten sam czynnik λ: $V \rightarrow \lambda r^3$, $r \rightarrow \lambda r$. Oznacza to, że dwie molekuły o średnicy 0,2 nm oddalone od siebie o 1 nm będą oddziaływały między sobą z taką samą energią co dwie sfery o średnicy 0,2 μm oddalone o 1 μm.

Literatura

[1] "Pierre-Gilles de Gennes - Nobel Lecture: Soft Matter". *Nobelprize.org.* Nobel Media AB 2013. Web. 10 Jul 2013. <http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/physics/laureates/1991/gennes-lecture.html>

[2] J. K. G. Dhont, G. Gompper, D. Richter „*Soft matter: complex materials on mesoscopic scale*" Schriften des Forschungszentrums Julich, Reihe Materie und Material/Matter and Materials Volume 10, 2002.

[3] R. Hołyst „*Miękka materia*", <http://pepe.ichf.edu.pl/Softmatter/miekka-materia.pdf>

[4] I. W. Hamley „*Introduction to Soft Matter*", JOHN WILEY & SONS. LTD, Weinheim Germany 2000.

[5] J. A. Tuszyński, M. Kurzyński „*Introduction to molecular biophysics*", CRC Press, Boca Raton, London, New Yoork, Washington, D.C. 2003.

[6] P. F. Dillon „*Biophysics A physiological Approach*", Cambridge University Press, New York, 2012.

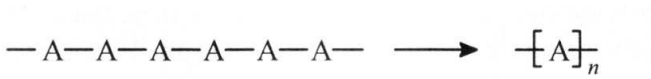
[7] L. Stryer „*Biochemia*", Wydawnictwa Naukowe PWN, Warszawa 2000.

[8] E. P. Solomon, L. R. Berg, D. W. Martin, C. A. Villee „Biologia", MULTICO Oficyna Wydawnicza, Warszawa 1996.

Rozdział 2 Elementy biofizyki molekularnej

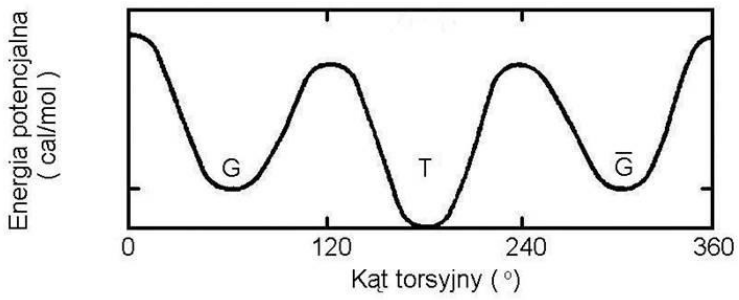
2.1 Makrocząsteczki biologiczne

Do grupy makrocząsteczek biologicznych zalicza się białka, kwasy nukleinowe, polisacharydy oraz lipidy. Specyficzna budowa tych związków determinuje właściwości i funkcje żywych komórek. Cząsteczki te należą do grupy związków chemicznych zwanych polimerami naturalnymi. Te makromolekularne układy zbudowane są z wielokrotnie powtarzających się jednakowych elementów strukturalnych, tak zwanych merów (A), połączonych wiązaniami kowalencyjnymi (rys. 2.1.). Polimery powstają podczas procesu polimeryzacji ze związków małocząsteczkowych (monomerów).



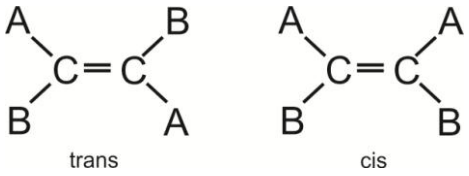
Rys. 2.1. Model łańcucha polimerowego.

Struktura układów polimerowych jest rozpatrywana na trzech poziomach: elementarnym, mikroskopowym i makroskopowym. Struktura cząsteczkowa na poziomie elementarnym opisuje budowę łańcucha polimerowego, jego konfigurację i konformację – strukturę I-rzędową oraz ukształtowanie czyli strukturę II-rzędową. Konfiguracja to przestrzenne ułożenie atomów lub grup atomów w makrocząsteczce. Konformacja opisuje rozmieszczenie w przestrzeni atomów danej makrocząsteczki powstałe w wyniku rotacji wokół wiązania lub kilku wiązań bez zmiany jej wewnętrznej budowy chemicznej, czyli konfiguracji. W polimerach wyróżnia się dwie konformacje łańcucha: trans (T) oraz gauche (G). W określonych warunkach, niektóre konformacje charakteryzują się najmniejszą, a inne większą energią potencjalną. Zależność energii potencjalnej dla konformacji trans (T) oraz gauche (G) przedstawia rysunek 2.2.



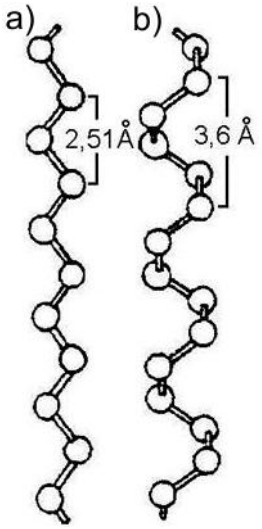
Rys. 2.2. Energia potencjalna dla konformacji trans (T) i gauche (G).

Są to tak zwane konformacje uporządkowane, o ściśle określonej sekwencji izomerów rotacyjnych w łańcuchu. Przykłady izomerów przedstawiono na rysunku 2.3.



Rys. 2.3. Izomery rotacyjne.

Przykłady konformacji łańcucha polimerowego przedstawiono na rysunku 2.4.



Rys. 2.4. Konformacje w układach polimerowych, trans (T) – kąt torsyjny 180°, konformacja gauche (G, $\overline{\text{G}}$) – kąt torsyjny 60° lub 300°: a) konformacja TTTT, b) konformacja TGT$\overline{\text{G}}$.

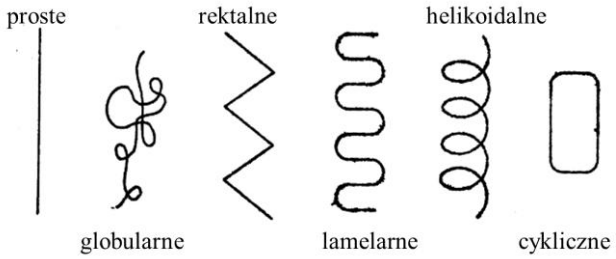
Każdy łańcuch polimerowy, w zależności od liczby wiązań (n) w nim obecnych, może przyjąć ($3n$) konformacji. Dodatkowo liczba ta zmienia się w wyniku ruchów termicznych. W takich warunkach makrocząsteczka przyjmuje kształt kłębka statystycznego, do którego opisu stosuje się metody statystyczne, przyjmując określony model łańcucha. Wielkość kłębka określa się za pomocą:

- średnio-kwadratowej odległości końców łańcucha $< r^2 >$;
- promienia żyracji (bezwładności) $< R_G >$, który definiuje się jako pierwiastek średniego kwadratu długości wektorów łączących wspólny środek ciężkości cząsteczki z poszczególnymi elementami jego budowy.

Konformacje uporządkowane determinują kolejną cechę łańcucha polimerowego, jego ukształtowanie (rys. 2.5.), które może być:

- proste (polimery włóknotwórcze i naturalne);
- globularne (polimery bezpostaciowe oraz roztwory polimerów);

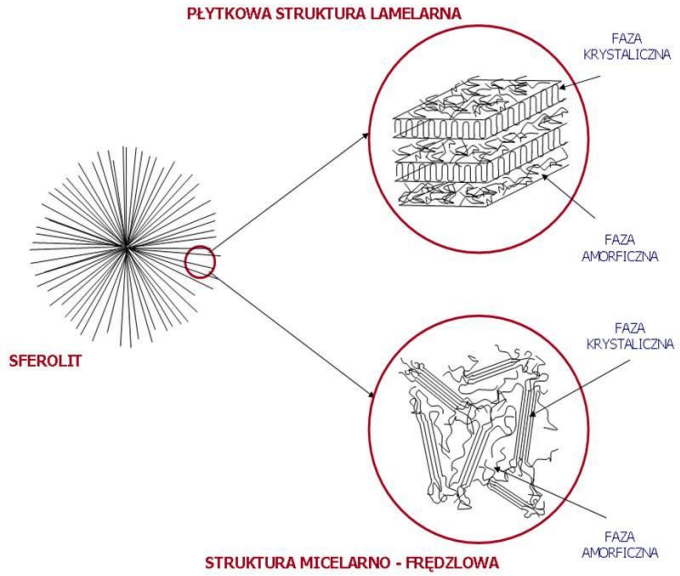
- izotaktyczne (polimery izotaktyczne np. polipropylen);
- lamelarne (polimery krystaliczne np. poliamidy);
- helikoidalne (polimery naturalne np. DNA);
- cykliczne (polisiloksany).



Rys. 2.5. Ukształtowanie głównego łańcucha polimerowego [1].

Struktura nadcząsteczkowa rozpatrywana na poziomie mikroskopowym, opisuje wzajemne ułożenie makrocząsteczek (struktura III-rzędowa), związana jest z tworzeniem się agregatów takich jak: kłębki, micele, płytkowe struktury lamelarne, sferolity. Oddziaływania międzycząsteczkowe (siły van der Waalsa oraz wiązania wodorowe) odpowiedzialne są za wiązanie makrocząsteczek w agregaty oraz za pojawienie się w układzie polimerowym faz uporządkowanych i nieuporządkowanych. W fazie amorficznej makrocząsteczki znajdują się w stanie nieuporządkowanym względem siebie, natomiast w fazie krystalicznej makrocząsteczki są uporządkowane. Struktury krystaliczne polimerów nazywane są krystalitami, a zespoły krystalitów tworzące agregaty kuliste sferolitami o rozmiarach 10nm-100μm. Na rysunku 2.6. przedstawiono modele struktury nadcząsteczkowej polimerów: płytkową strukturę lamelarną oraz strukturę micelarno-frędzlową, które charakteryzują się występowaniem zarówno fazy amorficznej jaki i krystalicznej.

W polimerach amorficznych występuje uporządkowanie bliskiego zasięgu, czyli istnieje pewna korelacja w rozmieszczeniu cząsteczek względem dowolnej, innej cząsteczki wewnątrz rozpatrywanego układu polimerowego. Odpowiedzialne za to uporządkowanie są lokalne oddziaływania między sąsiadującymi ze sobą grupami atomów w łańcuchu polimerowym. Makrocząsteczki przybierają w takim przypadku kształt kłębka Gaussa, którego promień żyracji opisany jest następującym wzorem: $< R^2_G >=< r^2 > / 6$.



Rys. 2.6. Struktura nadcząsteczkowa polimeru.

W polimerach krystalicznych, zbudowanych zarówno z obszarów amorficznych jak i krystalicznych, dla odległości większych od około pięciu średnic molekularnych, dominują oddziaływania dalekiego zasięgu (między segmentami znacznie oddalonymi od siebie), natomiast dla odległości mniejszych - oddziaływania bliskiego zasięgu. Oddziaływania dalekiego zasięgu ograniczają liczbę konformacji, którą może przyjąć łańcuch, co powoduje wzrost rozmiarów kłębka (efekt objętościowy). Rozpatrując budowę łańcucha polimerowego na poziomie molekularnym, w fazie krystalicznej można wyróżnić jego dwie uporządkowane konformacje:

- konformację rozciągniętego łańcucha z dominującą konfiguracją trans charakterystyczną dla struktur micelarnych;
- konformację pofałdowaną, gdzie łańcuchy tworzą warstwy, których wzajemne ułożenie prowadzi do powstania struktury lamelarnej.

Wielkością określającą ilościowy (objętościowy lub wagowy) udział fazy krystalicznej w polimerach jest stopień krystaliczności. Można go wyznaczyć metodą rentgenowską, przez pomiar ciepła topnienia lub krystalizacji oraz metodami NMR.

Struktura makroskopowa (poziom makroskopowy) opisuje rozmieszczenie oraz oddziaływania między elementami strukturalnymi układów polimerowych, upakowanie łańcuchów polimerowych, ich orientację i stopień splątania. Elementami strukturalnymi rozważanymi na tym poziomie struktury są polimery oraz składniki dodatkowe. Wzajemne oddziaływania łańcuchów prowadzą do powstania struktur splątanych lub sieci polimerowych. Oddziaływania ze strukturami dodatkowymi powodują powstanie obszarów

będących w kontakcie z powierzchnią napełniacza, charakteryzujących się specyficznymi właściwościami.

Ze względu na złożoność konfiguracji oraz możliwość tworzenia konformacji polimery dzielimy na homopolimery i kopolimery. Homopolimery, to polimery o tej samej powtarzającej się jednostce strukturalnej, otrzymane przez polimeryzację jednego rodzaju monomeru: A-A-A-A-A-A-A-A-A. Kopolimery składają się co najmniej dwóch różnych powtarzających się jednostek strukturalnych i otrzymywane są przez polimeryzację co najmniej dwóch rodzajów monomerów. Wyróżnia się:

- kopolimery statystyczne

  A-A-B-A-B-B-B-A-B-A-A-B-A-A-B-B-A-A-A-B
- kopolimery naprzemienne

  A-B-A-B-A-B-A-B-A-B-A-B-A-B-A-B-A-B-A-B
- kopolimery blokowe

  A-A-A-A-A-B-B-B-B-B-B-B-A-A-A-A-A-A-A
- kopolimery szczepione



Masa cząsteczkowa (M_n) jest jednym z najważniejszych parametrów charakteryzujących polimery. Jej wielkość wpływa na temperaturę topnienia, rozpuszczalność, zdolność do krystalizacji, własności reologiczne, a także na odporność chemiczną i termiczną materiałów polimerowych. Masę cząsteczkową wyznacza się z następującego wzoru:

$$M_n = xM_0,$$

gdzie M_0 jest masą cząsteczkową grupy merowej, a x stopniem polimeryzacji definiowanym jako liczba grup merowych w makrocząsteczce. W celu bardziej precyzyjnego określenia masy cząsteczkowej polimeru, jako zbioru makrocząsteczek o różnej masie cząsteczkowej M_i, wprowadza się pojęcie średniej masy cząsteczkowej wyrażanej wzorem:

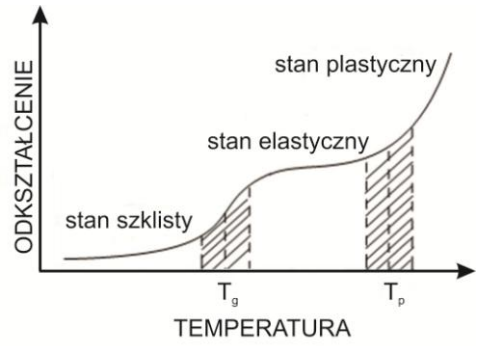
$$M_n = \frac{\sum n_i M_i}{\sum n_i},$$

gdzie n_i jest liczbą wszystkich makrocząsteczek w układzie polimerowym.

Polimery występują w dwóch stanach fizycznych:

- stałym (w fazach szklistej i wysokoelastycznej) – polimery amorficzne i krystaliczne;
- cieczowym (lepkoplastycznym) – polimery amorficzne.

Faza szklista charakteryzuje się zanikiem ruchliwości elementów strukturalnych polimeru. W temperaturze zeszklenia (T_g) obserwuje się przemianę fazową do stanu wyskoelastycznego, w której aktywowane są ruchy segmentalne łańcucha polimerowego. Ze stanu wysokoelestycznego, w temperaturze topnienia (T_m), polimer przechodzi w stan lepkosprężysty. W trakcie tego procesu następuje topnienie obszarów krystalicznych makrocząsteczek. Przemiany fazowe w polimerach zostały przedstawione na rysunku 2.7.



Rys. 2.7. Przemiany fazowe w polimerach.

Dodatkowo w polimerach naturalnych obserwowane są przemiany konformacyjne typu helisa-kłębek, które należą do przemian typu porządek-nieporządek. Polegają one na zmianach konformacyjnych makrocząsteczek, które odbywają się w wąskim przedziale temperatur, stężenia, pH. Przemiany te zaliczane są do zjawisk kooperatywnych, w których uczestniczy duża liczba segmentów makrocząsteczek. Przykładem przemiany helisa-kłębek jest denaturacja białek lub replikacja syntezy DNA na matrycy. Teoria Zimana i Bregga opisuje zachowanie makrocząsteczek podczas przemiany helisa-kłębek. Zakłada się w tej teorii, że makrocząsteczka białka składa się z N połączonych ze sobą segmentów (peptydy, mery). Każdy z segmentów może występować w dwóch stanach rotacyjnych: α-helisy (h) o stałej wartości kąta rotacji wewnętrznej φ_h i kłębka statystycznego (c). Makrocząsteczka taka posiada $2^N=(h+c)^N$ konformacji. Co oznacza, że może tworzyć sekwencję postaci: *hhhhcccchhcccchhhhhcccccc*… Każda konformacja $\{h, c\}_i$ o charakterystycznej sekwencji izomerów h i c posiada określoną wartość entalpii swobodnej $G_i\{h, c\}$. Znając sumę statystyczną Z_N można wyznaczyć wszystkie wartości średnie funkcji termodynamicznych opisujących przemianę fazową:

$$Z_N = \sum_{\{h,c\}_i} exp\left\{-\frac{G_i(h,c)}{kT}\right\}.$$

W obliczeniach uwzględnia się wszystkie możliwe kombinacje wiązań wodorowych między segmentami, gdyż to one muszą zostać zerwane, by dowolny segment przyjął dowolną konformację i przeszedł do stanu kłębka. Znając sumę statystyczną Z_N dla parametru σ, który opisuje stałą równowagi tworzenia się przerwy w sekwencji segmentów helisy bez zmiany całkowitej ich liczby, w zakresie $0 < \sigma < 1$ możliwe jest obliczenie wartości średniej ilości segmentów makrocząsteczki w stanie α-helisy $\theta = \frac{1}{N}\frac{\partial \ln Z_N}{\partial \ln s} = \frac{1}{2} + \frac{s-1}{2[(1-s)^2+4\sigma s]^{\frac{1}{2}}}$ jako funkcji parametru σ definiowanego jako:

$$\sigma = exp\left\{-\frac{S_{II}}{kT}\right\}$$

oraz parametru *s*:

$$s = exp\left\{-\frac{\Delta G_I}{kT}\right\}.$$

ΔG_I oznacza zmiana energii swobodnej dla procesu (I):

……..hhhhhhccc…… ↔ ……..hhhhh……

natomiast ΔS_{II} dotyczy zmiany entropii procesu (II):

…..hhc……..hhhhhhh…. ↔ ….hhh…-…hhhchhh….

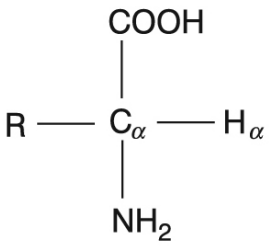
Przemiana helia-kłębek zachodzi przy zmianie parametru s w zakresie $1 - \sqrt{\sigma} \leq s \leq 1 + \sqrt{\sigma}$. Zakładając, że $s = 1 \pm \sqrt{\sigma}$ oraz $\Delta G_I = \Delta H - T\Delta S$ ze wzoru $s = exp\left\{-\frac{\Delta G_I}{kT}\right\}$ można wyznaczyć przedział temperatury dla „topnienia" α-helisy:

$$\Delta T = 2\sqrt{\sigma}\frac{kT_p}{\Delta H_p},$$

gdzie ΔH_p jest zmianą entalpii dla przemiany helisa-kłębek w temperaturze T_p. Dla małych, skończonych parametrów σ i $s \approx 1$ przejście następuje ze stanu prawie pełnej helisy, wówczas $\theta \approx 1$ do stanu pełnego kłębka ($\theta \approx 0$).

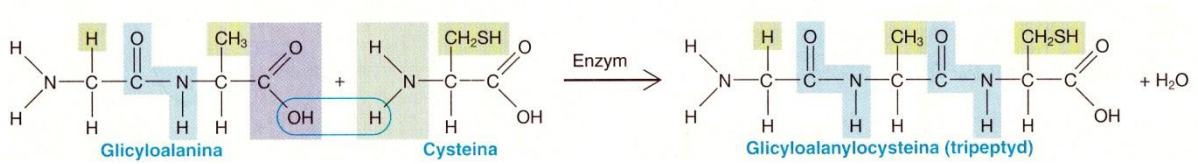
2.1.1 **Białka**

Białka należą do grupy polimerów naturalnych zwanych biopolimerami, są kopolimerami aminokwasów. Aminokwasy są zatem monomerami, czyli podstawowymi elementami strukturalnymi białek. Wzór strukturalny aminokwasu przedstawiono na rysunku 2.8. Właściwości chemiczne aminokwasów wynikają ze specyficznej ich budowy. W każdej cząsteczce wyróżnić można grupę aminową NH_2 i karboksylową COOH, które połączone są atomem węgla C_α. Aminokwasy różnią się między sobą łańcuchem bocznym. W skład białek wchodzi około 20 aminokwasów. Nazywa się je aminokwasami białkowymi. Makrocząsteczki zbudowane z 2-100 reszt aminokwasowych nazywane są peptydami (2-10 reszt – oligopeptydy, 10-100 reszt polipeptydy). Długie łańcuchy peptydowe to białka.

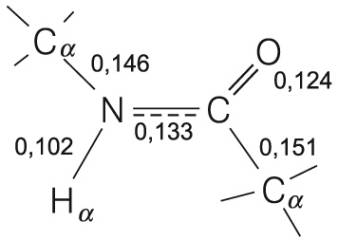


Rys. 2.8. Wzór strukturalny aminokwasu [4].

Aminokwasy łączą się ze sobą w charakterystyczny łańcuch polimerowy (rys. 2.9.) za pomocą wiązania peptydowego (rys. 2.10.). Jest to stosunkowo silne wiązanie, łączące atomy C–N. W wiązaniu tym występuje delokalizacja elektronu z wiązania podwójnego w grupie karbonylowej C=O na wiązanie C–N. W związku z tym, ma ono cechy wiązania podwójnego, co powoduje utrudnioną rotację wokół tego wiązania, to z kolei wpływa na specyficzną strukturę łańcuchów peptydowych. Peptyd tworzy łańcuch szkieletowy zbudowany z atomów wchodzących w skład wiązania peptydowego oraz węgla C_α, od którego odchodzą łańcuchy boczne reszt aminokwasowych. W ten sposób powstaje łańcuch o końcach aminowych (koniec N) i karboksylowych (koniec C).

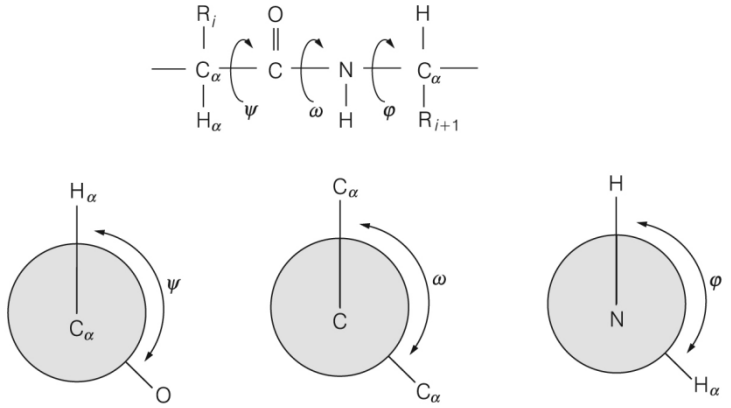


Rys. 2.9. Tworzenie wiązania peptydowego [12].



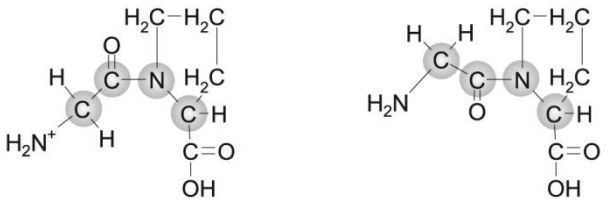
Rys. 2.10. Wiązanie peptydowe [4].

Białka wykazują budowę hierarchiczną. Struktura pierwszorzędowa białek definiuje liczbę i kolejność (sekwencję) aminokwasów w łańcuchu makrocząsteczki oraz określa wszystkie właściwości i funkcje biologiczne cząsteczek białka. Struktura drugorzędowa białek to przestrzenna struktura helikalna o określonej periodyczności, stabilizowana przez wewnątrzcząsteczkowe wiązania wodorowe. Elementy strukturalne wyznacza się dla tej struktury na podstawie geometrii łańcucha szkieletowego. Jest ona opisywana za pomocą kątów torsyjnych (ψ, ω, φ), które definiują możliwość obrotu cząsteczki (rys. 2.11.).



Rys. 2.11. Kąty torsyjne – definicja [4].

Kąt ω opisuje obroty wokół wiązania peptydowego. Ze względu na specyficzną budowę tego wiązania istnieją tylko dwie możliwe konformacje: *cis* i *trans* (rys. 2.12.). Przy czym konformacja *trans* jest dominująca w przyrodzie. Konformacja *cis* występuje rzadko. Kąty ψ i φ przyjmują wartości w pewnych określonych zakresach charakterystycznych dla odpowiednich struktur drugorzędowych.

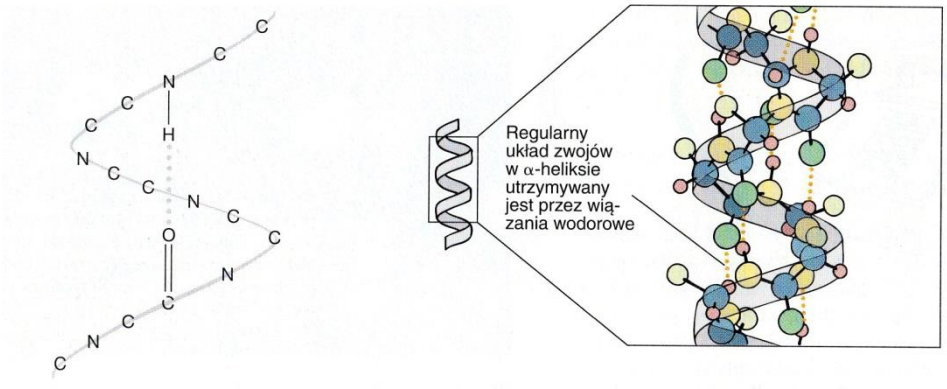


Rys. 2.12. Konformacje *cis* i *trans* dla wiązania peptydowego między glicyną i proliną [4].

Struktura drugorzędowa opisuje zatem konformację krótkich odcinków głównego łańcucha polipeptydowego bez uwzględniania konformacji łańcuchów bocznych reszt aminokwasowych. Do struktur drugorzędowych białek zalicza się α-helisę, β-harmonijkę, pętle i zgięcia.

Cechy charakterystyczne α-helisy (rys. 2.13.):

- na jeden zwój α-helisy przypada 3.6 reszt aminokwasowych;
- okres helisy obejmuje 5 zwojów, czyli 18 reszt aminokwasowych;
- stabilizowana jest przez wewnątrzcząsteczkowe wiązania wodorowe o kierunku równoległym do jej osi, dzięki temu helisa wykazuje sprężystość wzdłuż osi i swymi właściwościami przypomina sztywny pręt;
- wiązania OC-NH znajdują się w konformacji trans, a wiązania HN-CHR i RHC-CO- jako izomery rotacyjne obrócone o 120°;
- struktura helisy jest niezależna od otaczających ją cząsteczek białka – może samodzielnie istnieć w roztworze.

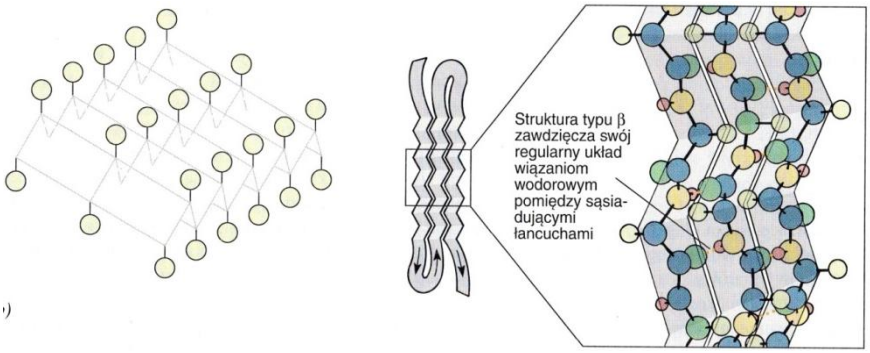


Rys. 2.13. α -helisa [12].

Cechy charakterystyczne β-harmonijki (rys. 2.14.):

- makrocząsteczki białka są bardziej rozciągnięte;

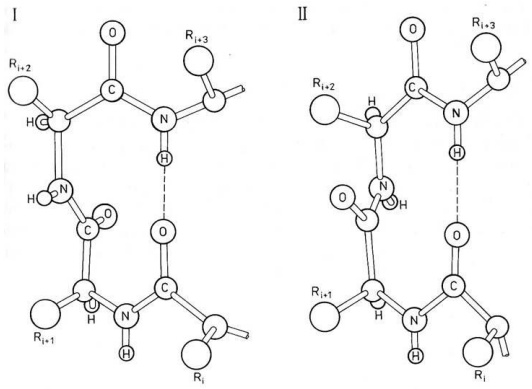
- stabilizujące wiązania wodorowe utworzone są między antyrównolegle ułożonymi łańcuchami;
- powstają struktury warstwowe, które występują w zbiorach makrocząsteczek spiętych za pomocą międzycząsteczowych wiązań wodorowych (mniejsze prawdopodobieństwo występowania takiej struktury w roztworze).



Rys. 2.14. β-harmonijka [12].

Cechy charakterystyczne β-zgięcia (zagięcie typu spinki do włosów) (rys. 2.15.):

- powstaje podczas zmiany kierunku łańcucha na przeciwny z równoczesnym zawinięciem z powrotem na siebie;
- ten rodzaj konformacji łączy kolejne antyrównoległe segmenty łańcucha polipeptydowego, makrocząsteczki białka są wówczas bardziej rozciągnięte;
- powstaje w obszarze czterech kolejnych reszt aminokwasowych;
- reszty aminokwasowe są upakowane blisko siebie tak, że łańcuchy boczne skierowane są na zewnątrz.

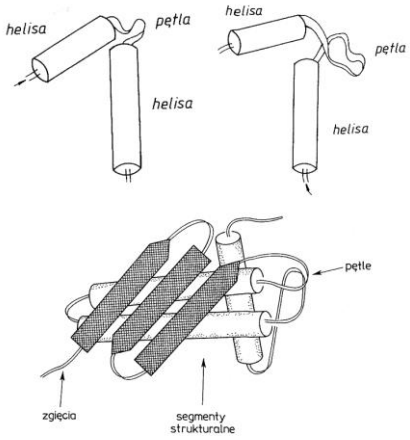


Rys. 2.15. β-zgięcie [9].

Cechy charakterystyczne pętli (rys. 2.16.):

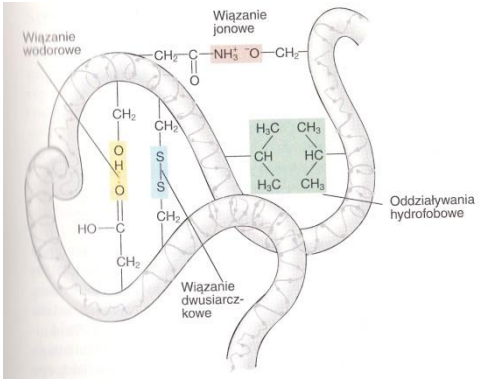
- nieregularne elementy struktury tworzące trójwymiarową strukturę białka;

- utworzone z 6-16 reszt aminokwasowych;
- łańcuchy boczne mogą być upakowane wewnątrz pętli;
- pętle są stabilizowane przez wiązania wodorowe tworzone przez łańcuchy boczne reszt aminokwasowych;
- pętle są miejscami wiążącymi np. substraty enzymów.



Rys. 2.16. Pętle [9].

Struktura trzeciorzędowa białek opisuje wzajemne przestrzenne ułożenie wszystkich elementów struktury drugorzędowej makrocząsteczki. (rys. 2.17.). Elementy te w przestrzeni tworzą charakterystyczne domeny α, β oraz α/β, które łączą się za pomocą nieukształtowanych fragmentów łańcucha (kłębka statystycznego).

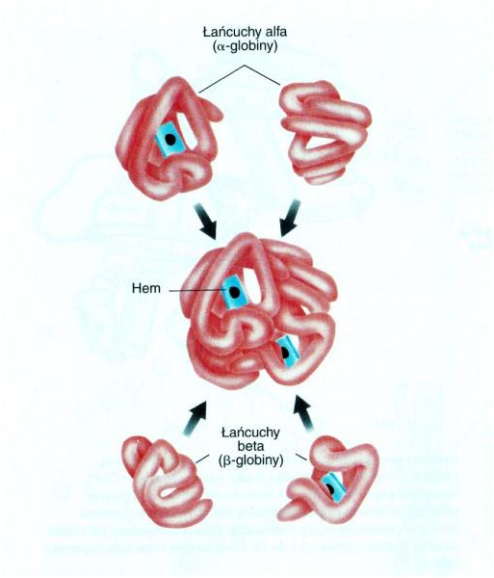


Rys. 2.17. Struktura trzeciorzędowa białek [11].

Odcinki helisy i fragmenty nieuporządkowane są rozmieszczone w określony sposób, uwarunkowany oddziaływaniami bocznych grup w łańcuchu oraz wiązań poprzecznych S-S (mostków siarczkowych/disulfidowych). Łańcuch peptydowy jest wówczas pofałdowany w sposób nieregularny, a podstawowym elementem tej struktury są domeny utworzone z odcinka łańcucha zawierającego od 50-150 reszt aminokwasowych, które tworzą globulę

o średnicy 2,5 nm. Struktura domenowa jest dodatkowo stabilizowana przez oddziaływania van der Waalsa oraz wiązania wodorowe.

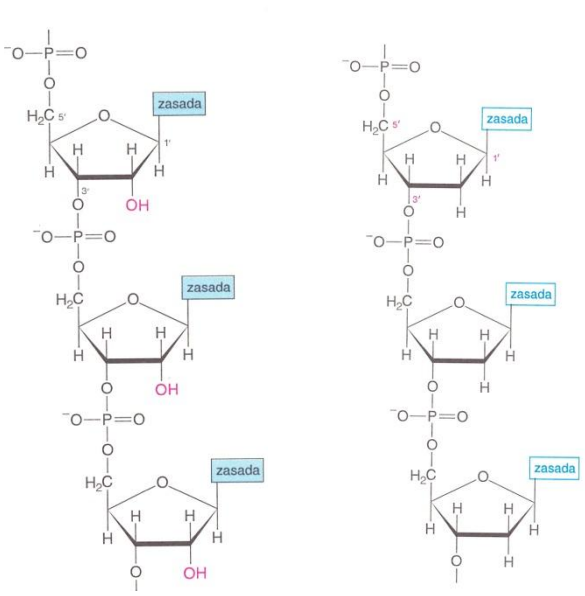
Struktura czwartorzędowa białek określa układ podjednostek białek (charakterystyczne asocjaty, dimery, trimery…) w przestrzeni oraz ich wzajemne kontakty i oddziaływania (rys. 2.18.). Poszczególne łańcuchy polipeptydowe tworzące podjednostki łączą się ze sobą wiązaniem wodorowym lub są stabilizowane za pomocą oddziaływania hydrofobowego i jonowego.



Rys. 2.18. Przykład struktury czwartorzędowej białka - hemoglobina [12].

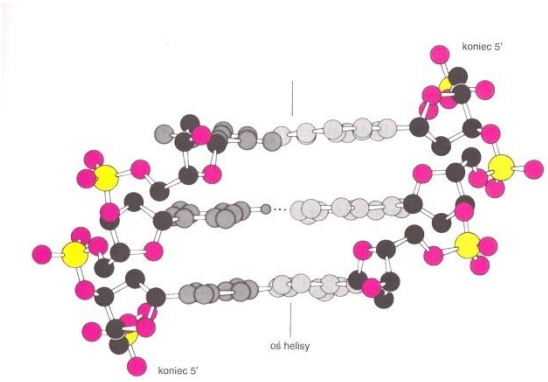
2.1.2 **Kwasy nukleinowe**

Kwasy nukleinowe (DNA, RNA) należą do grupy polimerów naturalnych zwanych biopolimerami, są kopolimerami nukleotydów i wykazują budowę hierarchiczną. Nukleotydy są podstawowymi elementami strukturalnymi kwasów nukleinowych. Zbudowane są z zasady azotowej (pochodna puryny lub pirymidyny), cukru (ryboza lub deoksyryboza), oraz grupy fosforanowej (PO_4^{3-}). Poszczególne nukleotydy łączą się ze sobą, reszta grupy fosforanowej jednego nukleotydu łączy się z pierścieniem rybozy/deoksyrybozy kolejnego nukleotydu poprzez węgiel C3’ tworząc łańcuch szkieletowy wyznaczony przez atomy O3’, C3’, C4’, C5’, O5’, P, pozostałe atomy tworzą łańcuch boczny makrocząsteczki (rys.2.19.).



Rys.2.19. Łańcuchy RNA i DNA [13].

Końcowe nukleotydy mają wolną grupę fosforanową przy atomie tlenu O5’ (koniec 5’) lub grupę hydroksylową przy atomie węgla C3’ (koniec 3’). Początkiem łańcucha jest koniec 5’ (rys.2.20.).

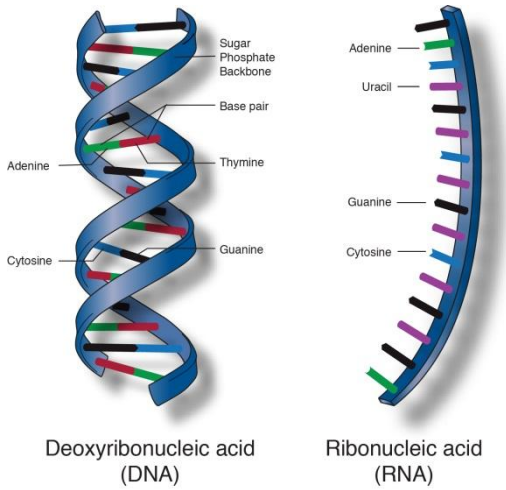


Rys.2.20. Model podwójnej helisy B-DNA [13].

W skład kwasu deoksyrybonukleinowy (DNA) wchodzi cukier cykliczny – deoksyryboza oraz zasady azotowe pochodne puryny – adenina i guanina oraz pirymidyny – cytozyna i tymina. W cząsteczce kwasu rybonukleinowego (RNA) zamiast tyminy występuje uracyl oraz cukier – ryboza. Zasada łączy się z cząsteczką cukru wiązaniem glikozydowym poprzez węgiel C1’ w rybozie i atom azotu N1 w pirymidynach i N9 w purynach. Cukier łączy się kowalencyjnym wiązaniem estrowym z resztami fosforowymi poprzez atomy tlenu O5’ i O3’ rybozy.

Cząsteczka kwasu rybonukleinowego najczęściej zbudowana jest z jednego skręconego w helisę łańcucha polimerowego, natomiast kwas deoksyrybonukleinowy przyjmuje formę podwójnej helisy, czyli dwóch splecionych ze sobą łańcuchów polinukleotydowych (rys. 2.21.).

Strukturę DNA po raz pierwszy opisali Watson i Crick. Za to odkrycie otrzymali w 1962 roku Nagrodę Nobla. *Cząsteczka DNA składa się z dwóch równoległych łańcuchów polinukleotydowych skręconych jeden wokół drugiego. Te dwa łańcuchy utrzymywane są razem pomocą wiązań wodorowych miedzy zasadami azotowymi, przy czym każda zasada jednego łańcucha jest przyłączona do swego „partnera" w drugim łańcuchu. Wiązania między zasadami są specyficzne: adenina łączy się z tyminą, a guanina z cytozyną (Crick 1960).*

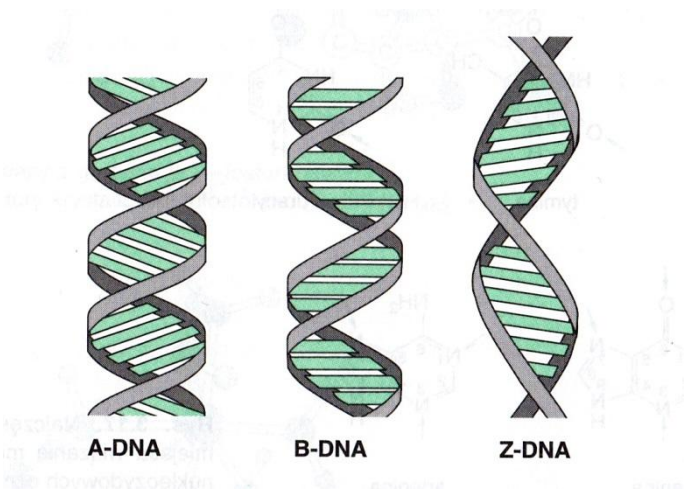


Rys. 2.21. Struktura DNA i RNA
[http://www.genome.gov/dmd/img.cfm?node=Photos/Graphics&id=85209].

Helisa DNA występuje w kilku formach strukturalnych (rys. 2.22.):

- A-DNA – skręt helisy: 2,186 nm, 11 nukleotydów, oś helisy oddalona od środka par zasad o 0,47 nm, pary zasad są skręcone względem płaszczyzny prostopadłej do helisy o 20° (HYBRYDA DNA-RNA podczas transkrypcji);
- B-DNA - skręt helisy: 3,4 nm, 10 nukleotydów, pary zasad są skręcone względem płaszczyzny prostopadłej do helisy o 6°, wzajemne skręcenie par zasad: A-T o 17 °, G-C o 11°;
- Z-DNA – skręt helisy: 4,46-4,57 nm, 12 nukleotydów, oś helisy oddalona od środka par zasad o 0,47 nm, pary zasad są skręcone względem płaszczyzny prostopadłej do

helisy o 7,4° lewoskrętna helisa (koliste cząsteczki DNA u *Prokaryota*, chromosomy *Eucaryota*).



Rys. 2.22. Struktury A-DNA, B-DNA i Z-DNA [10].

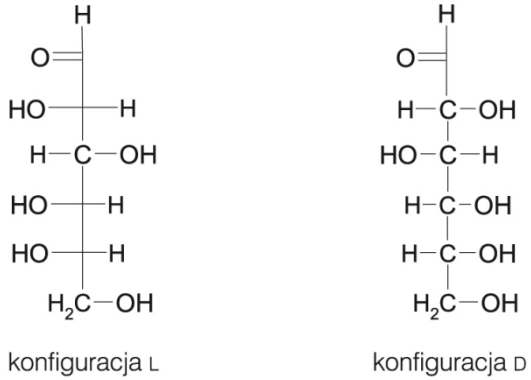
Struktura pierwszorzędowa kwasów nukleinowych określa liczbę i kolejność (sekwencję) nukleotydów w łańcuchu makrocząsteczki. Struktura drugorzędowa to przestrzenna struktura helikalna o określonej periodyczności, stabilizowana przez wewnątrzcząsteczkowe wiązania wodorowe lub pętle zbudowane z fragmentu pojedynczego łańcucha nukleotydowego. Struktura trzeciorzędowa kwasów nukleinowych to przestrzenne upakowanie elementów struktury drugorzędowej. Struktura ta jest utrzymywana poprzez wiązania wodorowe między zasadami azotowymi. Istnieją również struktury utworzone przez trzy łańcuchy nukleotydowe tak zwane trypleksy, które są stabilizowane przez powstawanie dodatkowych wiązań w parach Hoogsteena oraz poprzez obecność jonów Mg^{2+} oraz poliamin. W telomerach oraz w odcinkach promotorowych onkogenów obecne są również tetrapleksy. Są to fragmenty kwasu nukleinowego utworzone przez płaskie formy strukturalne, zbudowane z czterech zasad guaninowych, połączonych wiązaniami wodorowymi. Struktura taka jest stabilizowana przez obecność jonów K^+ i Na^+, które są koordynowane przez grupy karboksylowe guaniny.

2.1.3 **Polisacharydy**

Polisacharydy należą do grupy biopolimerów. Są kopolimerami mono lub disacharydów połączonych wiązaniem glikozydowym. Pod względem strukturalnym polisacharydy dzieli się na monosacharydy (cukry proste), disacharydy (dwucukry), oligosacharydy oraz polisacharydy (wielocukry).

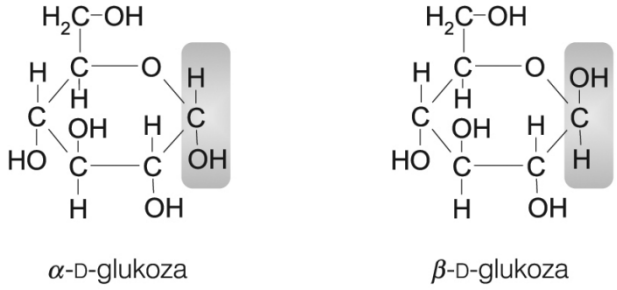
Pod względem chemicznym cukry proste są aldehydami lub ketonami zawierającymi wiele grup hydroksylowych OH. Monosacharydy aldehydowe zawierające grupę formylową nazywa się aldozami np. glukoza, natomiast monosacharydy ketonowe zawierające grupę karbonylową to ketozy np. fruktoza. W zależności od liczby atomów węgla w łańcuchu cukrowym wyróżnia się triozy, tetrozy, pentozy (np. ryboza) lub heksozy (np. glukoza).

Najbardziej rozpowszechnionym w przyrodzie cukrem prostym jest glukoza (rys.2.23.), która występuje w postaci izomerów przestrzennych o konfiguracji D i L.



Rys. 2.23. Struktura glukozy [4].

W roztworze liniowa forma D glukozy nie jest stabilna i przechodzi w formę cykliczną tworząc dwa izomery (anomery) α-D-glukozę lub β-D-glukozę (rys. 2.24.). Tworzy wówczas sześcioczłonowy pierścień piranozowy.



Rys. 2.24. Izomery glukozy pierścieniowej [4].

Disacharydy składają się z dwóch cząsteczek cukrów prostych połączonych wiązaniem *O*-glikozydowym. Wiązanie takie powstaje między dwiema cząsteczkami cukru poprzez atom węgla C1 i tlenu. Przykładami disacharydów są:

- laktoza zbudowana z galaktozy i glukozy;
- maltoza zbudowana z dwóch cząsteczek glukozy;
- sacharoza zbudowana z glukozy i fruktozy.

Makrocząsteczki polisacharydów są zbudowane z mono lub disacharydów i mogą tworzyć formy rozgałęzione. Przykładem takiego polimeru jest glikogen, skrobia, celuloza, chityna.

Cukry proste, dwucukry i oligosacharydy mogą tworzyć trwałe związki z białkami – glikoproteiny. Cząsteczki cukru łączą się z łańcuchem peptydowym za pomocą wiązań *O*-glikozydowych między atomem węgla w cząsteczce cukru a atomem tlenu w łańcuchu bocznym dwóch aminokwasów: seryny lub treoniny, a także za pomocą wiązania *N*-glikozydowego, gdy cząsteczka cukru łączy się z atomem azotu z łańcucha bocznego asparaginy.

2.1.4 **Lipidy**

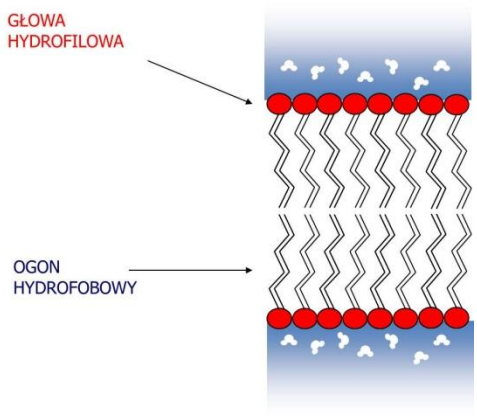
Lipidy według klasyfikacji Bloora [5] dzielimy na:

- lipidy proste – są to estry kwasów tłuszczowych z alkoholami;
- lipidy złożone – lipidy proste z dodatkową grupą chemiczną np. fosfolipidy, glikolipidy, lipoproteiny;
- pochodne lipidów zawierające sterole, steroidy, aldehydy tłuszczowe, witaminy (A, D, E, K).

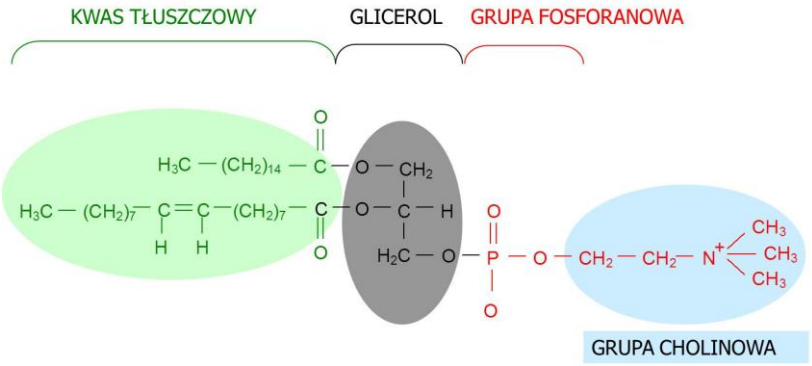
Kwasy tłuszczowe powstają w wyniku hydrolizy tłuszczów, czyli estrów kwasów tłuszczowych i glicerolu. Są to związki liniowe, zbudowane z łańcuchów węglowodorowych zakończonych grupą karboksylową (R-COOH), w których mogą występować wiązania pojedyncze (kwasy tłuszczowe nasycone) lub podwójne (kwasy tłuszczowe nienasycone). Właściwości kwasów tłuszczowych zależą od długości łańcucha węglowodorowego R oraz od liczby wiązań podwójnych w układzie.

Z punktu widzenia biofizyki najważniejszymi lipidami są te z grupy fosfolipidów i steroli, które są składnikami błon biologicznych.

Fosfolipidy są cząsteczkami amfifilowymi, których główną cechą jest rozpuszczalność w dwóch różnych rozpuszczalnikach, polarnym i niepolarnym. Układy takie zbudowane są z dwóch części: hydrofilowej „głowy” – dobrze rozpuszczalnej w wodzie oraz hydrofobowych „ogonów” – źle rozpuszczalnych w wodzie (rys. 2.25.). Budowa chemiczna fosfolipidu przedstawiona została na rysunku 2.26.



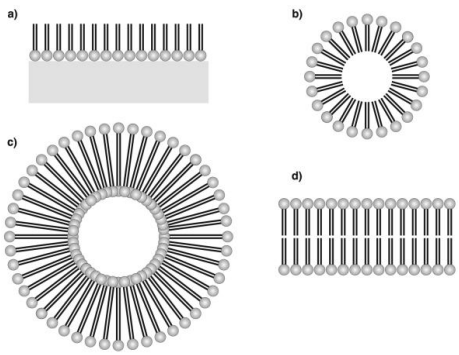
Rys. 2.25. Struktura błony fosfolipidowej.



Rys. 2.26. Chemiczna budowa przykładowej cząsteczki fosfolipidu.

Hydrofilowa głowa fosfolipidu zbudowana jest z cząsteczki glicerolu lub sfingozyny do których za pomocą wiązania estrowego dołączona jest grupa fosforanowa (reszta kwasu ortofosforowego) i dalej kolejne wiązanie estrowe łączy ją z cząsteczką choliny/seryny/etanoloaminy/cukru. Część hydrofobową cząsteczki fosfolipidu stanowią długie łańcuchy kwasów tłuszczowych.

W środowisku wodnym lipidy tworzą spontanicznie uporządkowane struktury: warstwy pojedyncze, micele, warstwy podwójne, bicele (rys. 2.27.).



Rys. 2.27. Struktury tworzone przez cząsteczki lipidów w środowisku wodnym, a) pojedyncza warstwa lipidowa; b) micela; c) bicela (liposom); d) dwuwarstwa lipidowa [4].

Takie zachowanie cząsteczek lipidowych wynika z ich właściwości amfifilowych. Struktury lipidowe są stabilizowane oddziaływaniami hydrofobowymi w obszarze łańcuchów kwasów tłuszczowych oraz oddziaływaniami elektrostatycznymi i wiązaniami wodorowymi w obrębie polarnych głów. To, jakie formy strukturalne (fazy) zostaną utworzone w wodzie zależą od stężenia lipidów w roztworze, pH i temperatury roztworu. Micele powstają w układzie po przekroczeniu pewnego stężenia lipidów w wodzie, tzw. krytycznego stężenia micelarnego *cmc* (ang. *critical micelle concentration*).

Utworzenie odpowiednich struktur przez cząsteczki amfifilowe zależy również od stopnia upakowania molekuł w danej fazie. Dana faza natomiast zależy od parametru zwanego krzywizną płaszczyzny międzyfazowej występującą pomiędzy amfifilem a środowiskiem wodnym. Powierzchniom międzyfazowym można przyporządkować dwa typy krzywizn: krzywiznę średnią definiowaną jako

$$H = \frac{c_1 + c_2}{2}$$

oraz krzywiznę Gaussa postaci:

$$K = c_1 c_2,$$

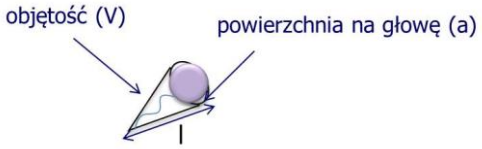
gdzie $c_1 = 1/R_1$, $c_2 = 1/R_2$ są krzywiznami głównymi o promieniach odpowiednio R_1 i R_2. Gęstość energii swobodnej związana z krzywizną powierzchni F jest sumą energii swobodnej związanej z krzywizną średnią F_H i Gaussa F_K:

$$F = F_H + F_K = \frac{1}{2}\kappa(c_1 + c_2 - c_0)^2 + \bar{\kappa}(c_1 c_2),$$

gdzie c_0 jest krzywizną spontaniczna powstającą przy braku ograniczeń, a κ i $\bar{\kappa}$ jest modułem elastyczności odpowiednio dla krzywizny średniej i Gaussa. Moduł elastyczności opisuje elastyczność warstw lipidowych. Dla zewnętrznych warstw miceli krzywizna średnia wynosi $1/R$, a krzywizna Gaussa $1/R^2$, natomiast dla płaskiej podwójnej warstwy wartość obu krzywizn wynosi 0.

Innym sposobem opisu upakowania amfifili na powierzchni międzyfazowej jest zastosowanie modelu kształtu. Zakłada się w nim, że siły hydrofobowe między ogonami surfaktantu, odpowiedzialne za asocjację molekuł, równoważą siły hydrofilowe między głowami a wodą. W takiej sytuacji energia oddziaływania układu osiąga minimum. Krzywizna międzyfazowa kontrolowana jest zatem poprzez oddziaływania powierzchni przekroju głowy cząsteczki i ogona hydrofobowego o danej długości. Zakładając, że

pojedyncze amfifile to stożki (rys. 2.28.) można wyznaczyć parametr upakowania sferycznych struktur micelarnych, znając objętość miceli oraz amfifili.



Rys. 2.28. Pojedyncza cząsteczka amfifilowa w modelu kształtu.

Stopień asocjacji układu p definiuje się jako stosunek objętości/powierzchni miceli do objętości/powierzchni pojedynczego amfifila:

$$p = \frac{\frac{4}{3}\pi R^3}{V}$$

lub w postaci uwzględniającej ich powierzchnie:

$$p = \frac{4\pi R^2}{a}.$$

Łącząc powyższe wzory otrzymuję się zależność:

$$\frac{V}{aR} = \frac{1}{3}.$$

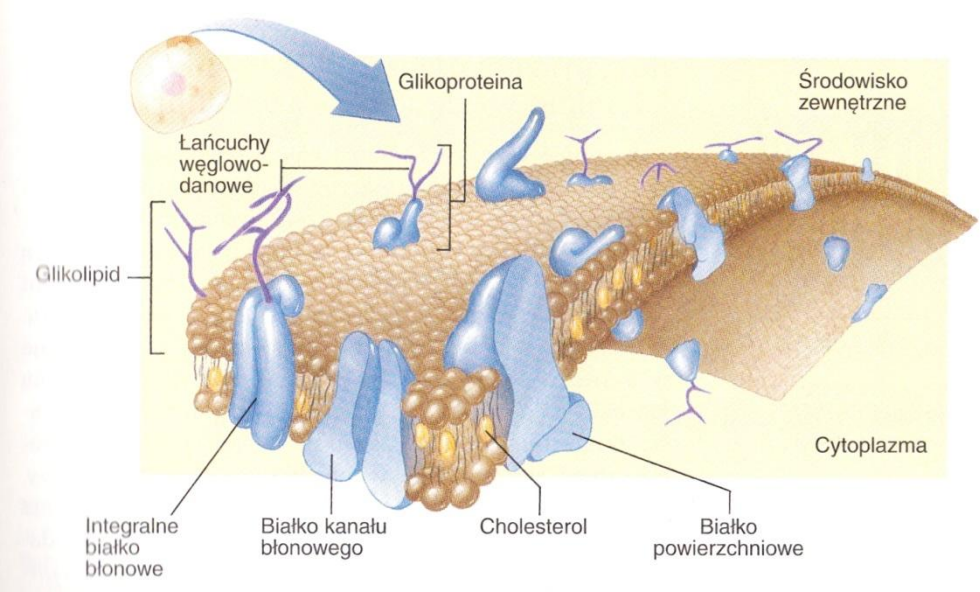
Promień miceli R nie przekracza długości całkowicie rozciągniętego łańcucha, w związku z tym prawdziwym staje się wyrażenie:

$$\frac{V}{al} \leq \frac{1}{3},$$

gdzie $\frac{V}{al} = N_s$ i jest parametrem upakowania cząsteczek amfifilowych w układzie micelarnym.

Błony biologiczne

Błony biologiczne to zorganizowane warstwowe układy makromolekularne o grubości około 10 nm, złożone głównie z kompleksów białkowo-tłuszczowo-węglowodanowych, w których skład wchodzą głównie białka (40%) oraz lipidy (60%) (rys. 2.29.). Cechami charakterystycznymi błon lipidowych jest płynność, asymetryczność oraz heterogoniczność.



Rys. 2.29. Model błony biologicznej według Singera i Nicholsa [12].

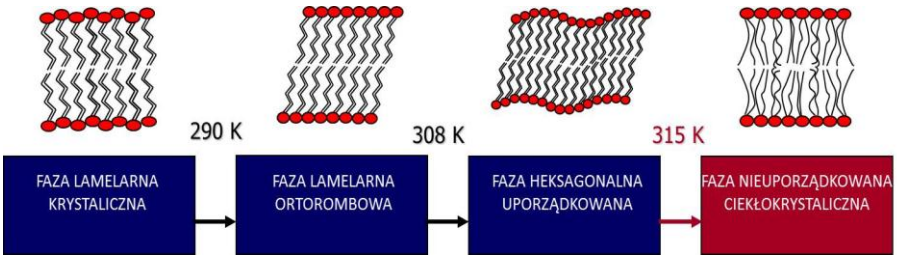
Wszystkie elementy składowe błony komórkowej znajdują się ciągłym ruchu. Dotyczy to zarówno białek błonowych jak i struktury dwuwarstwowej złożonej z łańcuchów lipidowych. W obrębie dwuwarstwy cząsteczki lipidów i białka mogą wykonywać ruch rotacyjny wokół osi prostopadłej do powierzchni błony jest to tzw. dyfuzja rotacyjna, mogą przemieszczać się w płaszczyźnie błony – dyfuzja lateralna. Cząsteczki lipidów mogą również przenosić się między warstwami w procesie flip-flop, za to zjawisko odpowiedzialne są enzymy błonowe, tak zwane flipazy. Na dynamikę błony biologicznej wpływ ma również ruch samych łańcuchów węglowodorowych, który zmniejsza upakowanie takiej błony i zwiększa jej efektywną objętość. Jest on zależny od temperatury oraz liczby wiązań nienasyconych w ogonie lipidowym.

Asymetryczność błony wynika z tego, że jej skład chemiczny nie jest jednakowy. Po stronie wewnętrznej – cytoplazmatycznej występują głównie fosfatydyloseryna i fosfatydyloetanoloamina. Fosfolipidy te mają albo naładowane elektrycznie głowy albo łatwo tworzą wiązania wodorowe. Zewnętrzna warstwa błony jest bogata w fosfatydylocholinę i swingomielinę oraz w glikoproteiny. Różnice w budowie warstw błony biologicznej generują różnicę potencjałów elektrycznych w poprzek błony.

Błonę charakteryzuje również pewna heterogeniczność, czyli niejednorodność w rozkładzie cząsteczek w błonie komórkowej, im więcej elementów strukturalnych w błonie tym układ jest bardziej nieuporządkowany. Istnieją jednak w błonie biologicznej pewne obszary uporządkowane, są to tak zwane domeny, kweole, czyli zagłębienia w błonie oraz tratwy lipidowe.

Błony lipidowe otaczają komórki oraz organella komórkowe (jądro, retikulum endoplazmatyczne), zapewniają stałość składu środowiska wewnętrznego komórki poprzez separację środowisk oraz równoczesne łączenie ich przez obszar, przez który odbywa się selektywny transport masy. Są to układy spolaryzowane elektrycznie z ładunkiem ujemnym od strony wnętrza błony. Ze względu na specyficzną budowę oraz właściwości błon biologicznych mogą one regulować transport poprzez selektywne bariery przepuszczalności, regulują jonowy oraz molekularny skład przedziałów komórkowych (pompy, kanały, przenośniki) oraz przepływ informacji poprzez receptory hormonów. Błony są również zdolne do przekształcania energii w procesach fotosyntezy i fosforylacji oksydacyjnej.

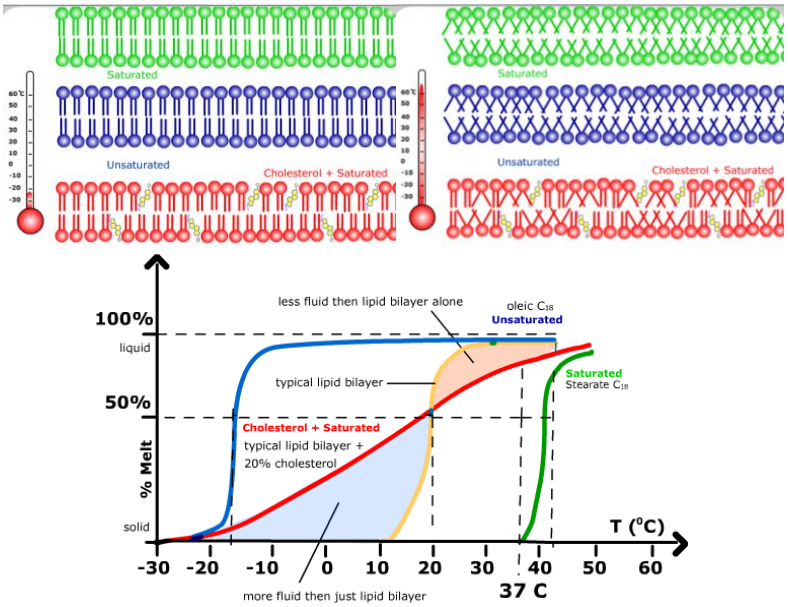
Błony biologiczne są bardzo wrażliwe na zmiany temperatury. Wraz z jej wzrostem dwuwarstwy lipidowe zmieniają swoją strukturę. W układach tego typu wyróżnia się dwie zasadnicze fazy: żelową oraz ciekłokrystaliczną (rys. 2.30.). W temperaturze pokojowej błona biologiczna zbudowana z fosfolipidów występuje w fazie lamelarnej krystalicznej, łańcuchy węglowodorowe są prostopadłe do płaszczyzny dwuwarstwy, a grupy metylenowe CH_2 są ściśle upakowane. W temperaturze 290K zachodzi przemiana fazowa tzw. *subtransition* do fazy lamelarnej ortorombowej, w której łańcuchy nachylone pod pewnym kątem do płaszczyzny warstwy, a grupy metylenowe są luźniej upakowane. Następnie w 308K obserwowane jest kolejne przejście fazowe tzw. *pretransition* do fazy heksagonalnej uporządkowanej, w której występuje charakterystyczne pofałdowanie w warstwach. Wszystkie te fazy należą do fazy żelowej. W temperaturze 315K występuje główne przejście fazowe z fazy żelowej do nieuporządkowanej fazy ciekłokrystalicznej. Obserwowane jest wtedy topnienie łańcuchów węglowodorowych oraz ich pofałdowanie, za które odpowiedzialne są przejścia konformacyjne trans-gauche skutkujące utratą uporządkowania w układzie [7].



Rys. 2.30. Przemiany fazowe w układach fosfolipidowych.

Obecność w strukturze błony lipidowej wiązań podwójnych oraz innych elementów np. cholesterolu zmienia zakres temperatur przy których występuje główna przemiana fazowa (rys. 2.31.). W układach zawierających nasycone łańcuchy węglowodorowe występuje ona

w temperaturach wyższych aniżeli w błonach zawierających nienasycone łańcuchy polimerowe i cholesterol.



Rys. 2.31. Przemiany fazowe w błonie biologicznej zawierającej łańcuchy węglowodorowe nasycone, nienasycone i cholesterol [http://telstar.ote.cmu.edu/biology/MembranePage/index2.html].

Literatura

[1] J. Koszkul „*Materiały polimerowe*”, Wydawnictwo Politechniki Częstochowskiej, Częstochowa 1999.

[2] W. Przygocki, A. Włochowicz „*Fizyka polimerów*”, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2001.

[3] H. Galina „*Fizykochemia polimerów*”, Oficyna Wydawnicza Politechniki Rzeszowskiej, Rzeszów 1998.

[4] G. Ślósarek „*Biofizyka molekularna*”, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2011.

[5] W. R. Bloor, Biochemistry of the fats. Chem. Rev. **2** (1925), 243.

[6] R. W. Kelsall, I. W. Hamley, M. Geoghean „*Nanotechnologie*”, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2008.

[7] T. Le Bihan, M. Pezolet, Chemistry and Physics of Lipids **94** (1998), 13.

[8] red. F. Jaroszyk „*Biofizyka*”, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2011.

[9] red. M. Bryszewska, W. Leyko „*Biofizyka dla biologów*”, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1997.

[10] S. J. Lippard, J. M. Berg „*Podstawy chemii bionieorganicznej*", Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1998.

[11] I. W. Hamley „*Introduction to Soft Matter*", JOHN WILEY & SONS. LTD, Weinheim Germany 2000.

[12] E. P. Solomon, L. R. Berg, D. W. Martin, C. A. Villee „Biologia", MULTICO Oficyna Wydawnicza, Warszawa 1996.

[13] L. Stryer „Biochemia", Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2000.

[14] J. A. Tuszyński, M. Kurzyński „*Introduction to molecular biophysics*", CRC Press, Boca Raton, London, New Yoork, Washington, D.C. 2003.

[15] P. F. Dillon „*Biophysics A physiological Approach*", Cambridge University Press, New York, 2012.

Rozdział 3 Biofizyka komórki

3.1 Czynność elektryczna błony komórkowej

Każda komórka otoczona jest błoną komórkową, która zapewnia z jednej strony integralność komórce, a z drugiej strony umożliwia selektywny transport różnych substancji. Hydrofobowy charakter wnętrza błony komórkowej jest barierą, która ogranicza transport cząsteczek. W komórce zatem istnieją specjalne mechanizmy wnikania substancji odżywczych oraz wydalania produktów przemiany materii, a także regulowania stężeń jonów, które odpowiadają za prawidłowe funkcjonowanie komórek. Transport jonów umożliwia również gromadzenie energii, która jest następnie wykorzystywana do przenoszenia sygnałów elektrycznych lub procesów transportu substancji wymagających nakładów energii. Za selektywny transport przez błony komórkowe odpowiedzialne są białka integralne i powierzchniowe obecne w błonie. Wyróżnia się dwa rodzaje białek transportujących:

- białka przenoszące (nośniki) wiążą cząsteczki, które mają przenosić przez błonę, w wyniku tego dochodzi do licznych zmian konformacyjnych w obrębie białka i cząsteczka jest przenoszona z jednej strony błony na drugą – transport ten wymaga nakładów energii (tzw. transport aktywny);
- białka tworzące kanały i pory, które otwierane są pod wpływem bodźców chemicznych, elektrycznych, czy mechanicznych, umożliwiają one przechodzenie przez błonę substancji hydrofilowych, głównie jonów w kierunku działania bodźca (tzw. transport bierny).

Zmiana:

- pola elektrycznego pojawiająca się na skutek zmian potencjału elektrycznego komórki;
- rozkładu ładunku wzdłuż łańcucha białkowego;
- polarności fragmentów cząsteczki białka

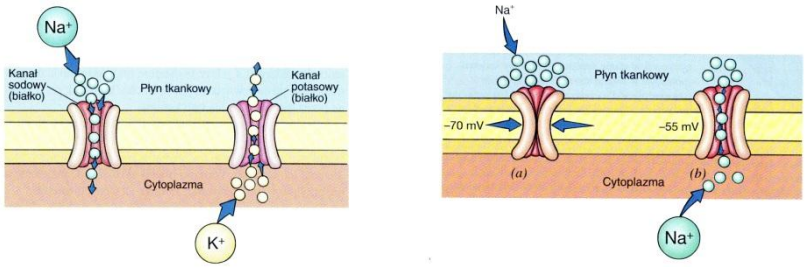
powoduje zmianę oddziaływań w białku, co może wpłynąć z kolei na zmianę jego konformacji lub kształtu cząsteczki.

Potencjał elektryczny błony komórkowej wiąże się z obecnością jonów i ich selektywnym transportem przez błonę. Występuje on w poprzek błony ze względu na różnice we właściwościach elektrycznych środowisk, które błony rozdzielają. Wyróżnia się dwa rodzaje potencjałów w komórce: spoczynkowy i czynnościowy.

3.1.1 **Potencjał spoczynkowy**

Potencjał spoczynkowy błony komórkowej jest definiowany jako stały potencjał elektryczny błony w stanie niepobudzonym, będący konsekwencją występowania procesów biernego i czynnego transportu przez błonę. Zdolność komórki do utrzymywania stałej wartości potencjału spoczynkowego związana jest bezpośrednio z istnieniem różnicy stężeń niektórych jonów pomiędzy wnętrzem i otoczeniem komórki. Wartość tego potencjału zależy od rodzaju komórki. Dla neuronu wynosi on -60 mV do -80 mV, natomiast dla komórki mięśnia poprzecznie prążkowanego leży w zakresie od -80 mV do -90 mV.

Dla większości komórek jonami "najważniejszymi" z punktu widzenia potencjału spoczynkowego są jony sodu, potasu oraz chlorkowe. Jony te dyfundują poprzez kanały białkowe w wyniku dyfuzji ułatwionej zgodnie z gradientem stężeń (rys. 3.1.). Kanały te są aktywowane poprzez zmiany napięcia w błonie komórkowej.



Rys. 3.1. Transport jonów przez kanały błonowe [11].

Najczęściej spotykany rozkład stężeń jonów w komórce jest następujący (Tabela 3.1.):

- na zewnątrz komórki stężenie jonów sodowych i chlorkowych jest większe niż wewnątrz komórki;
- stężenie jonów potasu jest większe wewnątrz komórki niż na zewnątrz.

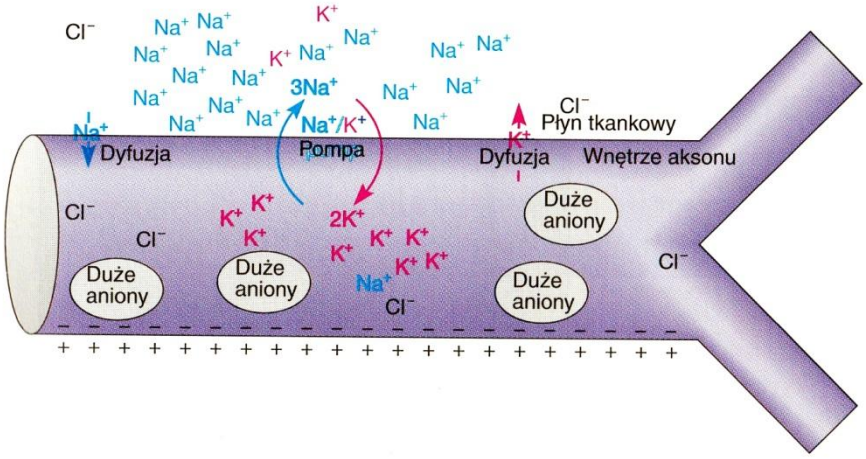
Tabela 3.1. Stężenie jonów w komórce.

Rodzaj jonu	Stęż. zewn. kom.	Stęż. wewn. kom.
K^+	4 mM	140 mM
Na^+	144 mM	ok. 10 mM
Cl^-	114 mM	ok. 4 mM

Stała wartość potencjału błonowego może być utrzymana jedynie wtedy, gdy całkowity ładunek przepływający przez błonę jest równy zeru (w przeciwnym razie następowałaby zmiana ładunku błony i związana z tym zmiana potencjału). Suma ładunków przenoszonych przez jony w jednostce czasu (suma prądów jonowych) jest równa zero:

$I_{Na} + I_K + I_{Cl} = 0$. W stanie spoczynku najlepiej przepuszczane są jony potasu, gorzej chlorkowe, najgorzej zaś sodowe.

Transport substancji wymaga zadziałania pewnych bodźców termodynamicznych, są to najczęściej: różnica stężeń substancji między wnętrzem błony a środowiskiem zewnętrznym, różnica potencjałów elektrycznych wewnątrz i na zewnątrz błony, różnica ciśnień hydrostatycznych lub osmotycznych. Transport błonowy odbywa się poprzez transport bierny – dyfuzję prostą oraz dyfuzję ułatwioną oraz transport aktywny (rys. 3.2.). Dyfuzja prosta odbywa się wówczas, gdy istnieje różnica stężeń substancji między wnętrzem a środowiskiem zewnętrznym komórki. Strumień przenoszonej substancji jest wówczas proporcjonalny do gradientu stężenia $\frac{\mathrm{d}c}{\mathrm{d}x}$. Proces dyfuzji prostej opisuje prawo Ficka.



Rys. 3.2. Rodzaje transportu jonów przez błonę komórkową [11].

Przepływ jest definiowany jako strumień *J*, na przykład masy, energii lub ładunku. O realizacji przepływu decyduje siła termodynamiczna *X* (na przykład różnica stężeń cząsteczek w różnych częściach układu, różnica temperatur, różnica potencjałów elektrycznych). Strumień zatem można zdefiniować jako:

$$\boldsymbol{J}_i = \sum_j L_{ij} \boldsymbol{X}_j,$$

gdzie L_{ij} są współczynnikami kinetycznymi (fenomenologicznymi). Procesy przepływu, które zachodzą w tym samym czasie, wzajemnie na siebie wpływają. Są to tak zwane procesy sprzężone. Stopień sprzężenia między przepływami jest następujący:

$$q_{ik} = \frac{L_{ik}}{L_{ii} L_{kk}}.$$

W warunkach nierównowagowych procesem nieodwracalnym związanym z przepływem masy jest dyfuzja. Dyfuzja jest opisywana PIERWSZYM PRAWEM FICK'A postaci:

$$J = \frac{1}{A}\frac{dn}{dt} = -D\frac{dc}{dx},$$

gdzie *n* jest liczbą moli substancji, a *D* współczynnikiem dyfuzji translacyjnej. Co oznacza, że przepływ materii *J* (strumień masy) w jednostce objętości *A* jest proporcjonalny do gradientu stężenia $\frac{\mathrm{d}c}{\mathrm{d}x}$ wzdłuż osi *x*. Pierwsze prawo Ficka stosuje się w przypadku, gdy gradient stężenia nie zmienia się w funkcji czasu. W przypadku, gdy obserwowany jest proces dyfuzji, a gradient stężenia zmienia się w funkcji czasu, wówczas do opisu ruchu cząsteczek stosuje się DRUGIE PRAWO FICKA postaci:

$$\frac{dc}{dt} = D\frac{d^2c}{dx^2}.$$

Dla dwóch roztworów o stężeniach c_1 i c_2 rozdzielonych błoną biologiczną utrudniającą dyfuzję prawo Ficka można napisać w postaci:

$$\frac{dn}{dt} = PA(c_1 - c_2),$$

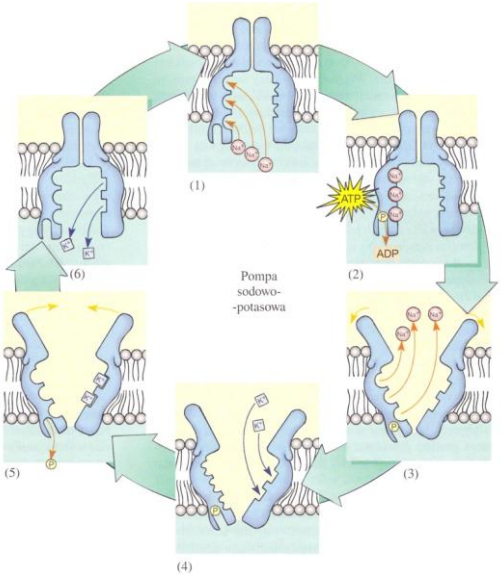
gdzie *P* jest przepuszczalnością błony mierzoną w m/s.

Dyfuzja ułatwiona (transport ułatwiony) odbywa się za pośrednictwem białek błonowych, które tworzą kanały jonowe. Proces ten jest ograniczony przez obecność białkowych por, w związku z tym przy dużych stężeniach substancji transportowanej, strumień *J* osiąga wartość maksymalną.

Prądy jonowe płynące przez błonę komórki w stanie spoczynku mają małe wartości, to jednak po pewnym czasie doprowadzałyby one do wyrównania wewnątrz- i zewnątrzkomórkowych stężeń jonów. Utrzymanie stałej różnicy stężeń jonów pomiędzy wnętrzem i otoczeniem komórki jest możliwe dzięki transportowi aktywnemu (tzn. wymagającego nakładu energii), zachodzącemu w kierunku przeciwnym niż dyfuzja.

Transport aktywny odbywa się w kierunku przeciwnym do działającego bodźca, wymaga zatem dostarczenia energii oraz zaangażowania nośników – białek transportujących. Związanie przez białko substancji przenoszonej wywołuje w nim zmiany konformacyjne. W ten sposób cząsteczka jest przenoszona z jednej strony błony na drugą. Dodatkowo białka transportujące wykazują powinowactwo do określonych substancji, które zmienia się

w zależności od środowiska. Inne jest w kontakcie z wnętrzem komórki, inne na zewnątrz. Nośniki te mogą zatem transportować tylko wybrane cząsteczki, a kierunek takiego transportu odbywać się musi z obszaru o wyższym powinowactwie chemicznym nośnika do przenoszonych cząsteczek do obszaru o powinowactwie niższym. Energia, uzyskiwana z rozpadu cząsteczki ATP (kwasu adezynotrifosforanowego) potrzebna jest w tym procesie do utrzymania różnicy powinowactwa chemicznego w błonie. Przykładem takiego transportu jest działanie pompy sodowo-potasowej (rys. 3.3.).



Rys. 3.3. Pompa sodowo-potasowa [11].

Pompa sodowo-potasowa (Na^+/K^+-ATPaza) to białko błonowe – enzym, który jest odpowiedzialny za utrzymanie odpowiedniego rozkładu jonów po obu stronach błony biologicznej i decyduje o ich przepływie, bierze udział w przewodzeniu impulsów nerwowych oraz reguluje ciśnienie osmotyczne. Białko to jest kompleksem zbudowanym z trzech podjednostek α, β i γ, które może występować w dwóch stanach konformacyjnych E_1 oraz E_2. Podjednostka α zawiera miejsca wiązania jonów sodu i potasu oraz miejsce wiązania ATP. Cykl pracy pompy sodowo-potasowej (tzw. schemat Albersa-Posta) rozpoczyna się od przyłączenia do Na^+/K^+-ATPazy znajdującej się w stanie konformacyjnym E_1 trzech jonów Na^+ oraz cząsteczki ATP, wówczas dochodzi do dysocjacji cząsteczki ATP na ADP (kwas adezynodifosforanowy) i grupę fosforanową HPO_4^{-2} (P_i), która pozostaje związana z resztą kwasu asparaginowego Na^+/K^+-ATPazy (proces fosforylacji). Procesy przyłączenia jonów sodu oraz fosforylacja Na^+/K^+-ATPazy powoduje zmiany konformacyjne w cząsteczce białka. Enzym przechodzi w stan konformacyjny E_2, znacznie zmniejsza się jego powinowactwo do jonów sodu, a silnie wzrasta do jonów potasu K^+. Umożliwia to

przeniesienie jonów Na^+ na zewnątrz komórki, a przyłączane są dwa jony K^+, któremu towarzyszy odłączenie grupy fosforanowej P_i (defosforylacja enzymu). Jony potasu wnikają do wnętrza kanału i przyłączana jest kolejna cząsteczka ATP. Umożliwia to otwarcie kanału i uwolnienie jonów potasu. Białko wraca wówczas do stanu konformacyjnego E_1.

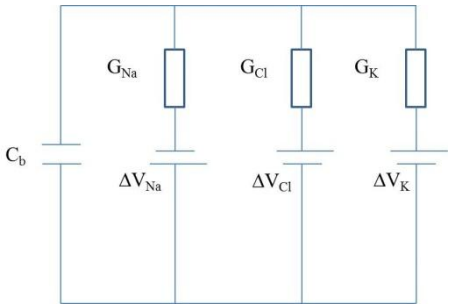
W wyniku transportu aktywnego energia gromadzona jest w układzie w formie różnicy stężeń i może być uwolniona, gdy dojdzie do przepływu substancji od stężenia wyższego do niższego.

Pompa sodowo potasowa wprowadza do komórki 3 jony sodu, a wyprowadza 2 jony potasu. Oznacza to, że u układzie pojawia się różnica potencjałów między wnętrzem komórki a środowiskiem zewnętrznym. Pompa wpływa również na wartość ciśnienia osmotycznego poprzez liczbę jonów Na^+ i K^+ wprowadzonych do wnętrza komórki, a wielkość tego ciśnienia decyduje o rozmiarach komórki.

Błona komórkowa posiada po obu swoich stronach ładunek o przeciwnym znaku, zachowuje się zatem jak kondensator. Jony potasu, które w procesie dyfuzji są transportowane na zewnątrz komórki odpowiedzialne są za powstanie różnicy potencjałów elektrycznych w błonie. Można zatem komórkę potraktować jak ogniwo stężeniowe o sile elektromotorycznej ΔV. Każdy otwarty kanał potasowy generuje siłę elektromotoryczną wywołującą ruch jonów potasu w kierunku malejącego stężenia. Kanały zatem są przewodnikami elektrycznymi o oporze elektrycznym *R*. Przewodnictwo *G* błony komórkowej o *N* liczbie kanałów każdy o oporze *R* wynosi:

$$G = \frac{N}{R}.$$

Błonę komórkową można zatem traktować jako obwód elektryczny zawierający elementy związane z przewodnictwem jonów. Schemat modelu elektrycznego błony przedstawiono na rysunku 3.4.



Rys. 3.4. Elektryczny model błony komórkowej.

W modelu tym gradienty stężeń poszczególnych jonów przedstawione są za pomocą ogniw o odpowiedniej polaryzacji, związanej z kierunkiem przepływu danych jonów, szeregowo

dołączony opornik w każdym z ogniw odpowiada kanałowi jonowemu. Kondensator natomiast odzwierciedla błonę biologiczną o pojemności C_b. Jest on ładowany przez trzy ogniwa, których siły elektromotoryczne są równe potencjałom równowagi jonów sodowych, potasowych i chlorkowych. Przewodnictwo błony jest ściśle związane ze zdolnością błony do transportu jonów i zmienia się wraz ze stężeniem tych jonów. Zgodnie z prawem Ohma można dla takiego obwodu wyliczyć wartości prądów jonowych I_K, I_{Na}, I_{Cl} w każdym z kanałów:

$$I_K = G_K(\Delta V_b - \Delta V_K)$$
$$I_{Na} = G_{Na}(\Delta V_b - \Delta V_{Na})$$
$$I_{Cl} = G_{Cl}(\Delta V_b - \Delta V_{Cl}),$$

gdzie ΔV_b jest potencjałem spoczynkowym błony, a ΔV_K, $\Delta V_{Na}, \Delta V_{Cl}$ są potencjałami równowagowymi jonów potasu, sodu i chloru, G_K, G_{Na}, G_{Cl} przewodnictwem elektrycznym tych jonów. W stanie stacjonarnym $I_{Na} + I_K + I_{Cl} = 0$. Jeżeli jony chloru są w równowadze, to można potencjał spoczynkowy błony wyrazić za pomocą następującego równania:

$$\Delta V_b = \frac{G_K}{G_K + G_{Na}} \Delta V_K + \frac{G_{Na}}{G_K + G_{Na}} \Delta V_{Na}.$$

Potencjał spoczynkowy błony biologicznej jest więc średnią ważoną potencjałów równowagowych jonów sodu i potasu, gdzie wagą jest stosunek przewodnictwa wywołanego przepływem danego jonu do całkowitego przewodnictwa błony.

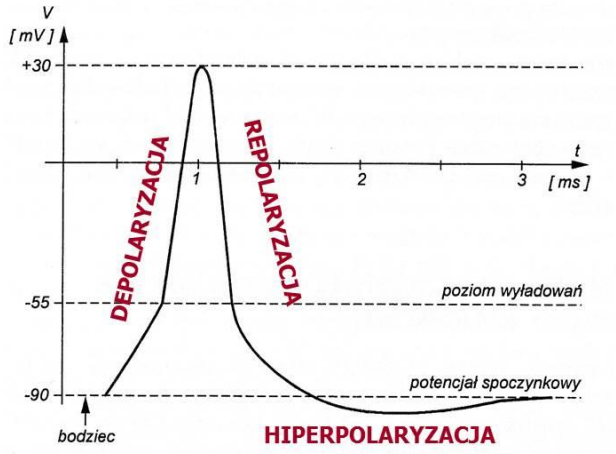
3.1.2 **Potencjał czynnościowy błony**

Potencjał czynnościowy błony komórkowej powstaje w wyniku pobudzenia komórki bodźcem elektrycznym. Jest to pewne zaburzenie potencjału spoczynkowego, które rozprzestrzenia się wzdłuż błony komórkowej. Zmiana potencjału błonowego zależy od amplitudy przyłożonego impulsu. Obserwuje się wówczas następujące procesy:

- reakcję bierną (lokalną) spowodowaną impulsem słabym, który powoduje chwilowe podwyższenie potencjału wewnątrz komórki, zmiana to maleje wraz z odległością od elektrody pobudzającej ze stałą przestrzenną mniejszą niż 1 cm;
- reakcję czynną (lokalną) występującą, gdy amplituda bodźca jest nieco większa niż w przypadku reakcji biernej, bodziec taki powoduje silniejszy wzrost potencjału niż zmiana natężenia bodźca ale zmiana potencjału utrzymuje się na poziomie poniżej 10 mV;
- potencjał czynnościowy, który występuje powyżej pewnego progu pobudliwości to znaczy powyżej pewniej wartości natężenia bodźca, jest to tak zwane natężenie

progowe/poziom wyładowań, obserwuje się wówczas gwałtowną zmianę potencjału o około100 mV.

Przebieg potencjału czynnościowego został przedstawiony na rysunku 3.5. Obserwuje się w tym przebiegu gwałtowny wzrost potencjału błonowego odpowiadający procesowi depolaryzacji błony komórkowej. W czasie trwania potencjału czynnościowego (około 0,5-2 ms dla komórki nerwowej) błona jest w stanie refrakcji bezwzględnej, co oznacza, że nie jest możliwe wywołanie następnego potencjału czynnościowego. Następnie występuje w tym przebiegu okres refrakcji względnej (kilka ms), w tym okresie błona ma podwyższony próg pobudliwości, przez co wywołanie kolejnego potencjału czynnościowego jest trudne. Tylko bodziec o natężeniu większym od wartości progowej może wywołać potencjał czynnościowy. Amplituda potencjału czynnościowego nie zależy od natężenia bodźca. Wówczas każdy bodziec o natężeniu przekraczającym wartość progową wywołuje taki sam potencjał czynnościowy, jest to zasada – „wszystko albo nic". Po wywołaniu potencjału komórka przez pewien czas nie reaguje na następny bodziec – trwa to od momentu spadku potencjału (proces repolaryzacji) do wartości około 1/3 wartości amplitudy. W czasie trwania potencjału hiperpolaryzacyjnego oraz następującego po nim potencjału następczego depolaryzacyjnego układ wraca do wartości potencjału spoczynkowego.



Rys. 3.5. Przebieg potencjału czynnościowego błony komórkowej.

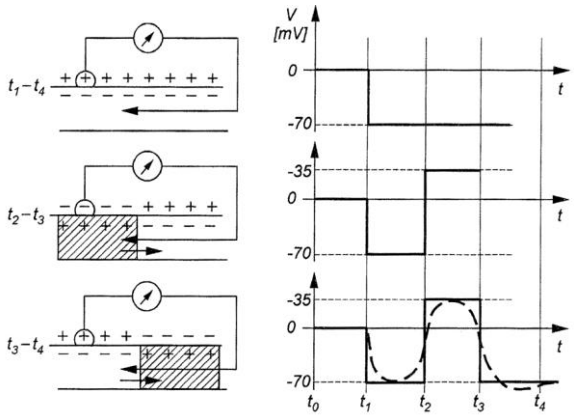
Za powstawanie potencjału czynnościowego komórki odpowiedzialne są prądy jonowe, głownie transport przez błonę komórkową jonów sodu i potasu. W fazie depolaryzacji wzrost potencjału spoczynkowego błony związany jest z szybkim otwarciem kanałów błonowych i napływem do wnętrza komórki dodatnich jonów sodowych zgodnie z gradientem stężeń. Dzieje się tak, gdy potencjał błony przekroczy wartość progową. W czasie repolaryzacji obserwowane jest zmniejszenie się potencjału błony komórkowej na skutek wypływu jonów potasowych z komórki zgodnie z gradientem stężeń. Ustaje wówczas dokomórkowy prąd

sodowy i wzrasta odkomórkowy prąd potasowy. Otwarcie kanałów potasowych jest inicjowane przez wzrost potencjału błony komórkowej. Na skutek wypływu ładunków dodatnich z wnętrza komórki wartość potencjału błony spada.

Skutkiem inaktywacji kanałów sodowych jest pojawienie się zjawiska refrakcji błony, czy zmniejszenia jej wrażliwości na bodźce. Natomiast pojawienie się hiperpolaryzacyjnego potencjału następczego związane jest z opóźnieniem w zamykaniu się kanałów potasowych po osiągnięciu przez komórkę potencjału spoczynkowego. Hiperpolaryzacja znika, gdy ustanie prąd potasowy. Przebieg potencjału czynnościowego może się różnić w zależności od rodzaju tkanek w którym jest on wywoływany.

3.2 Rejestracja sygnałów elektrycznych

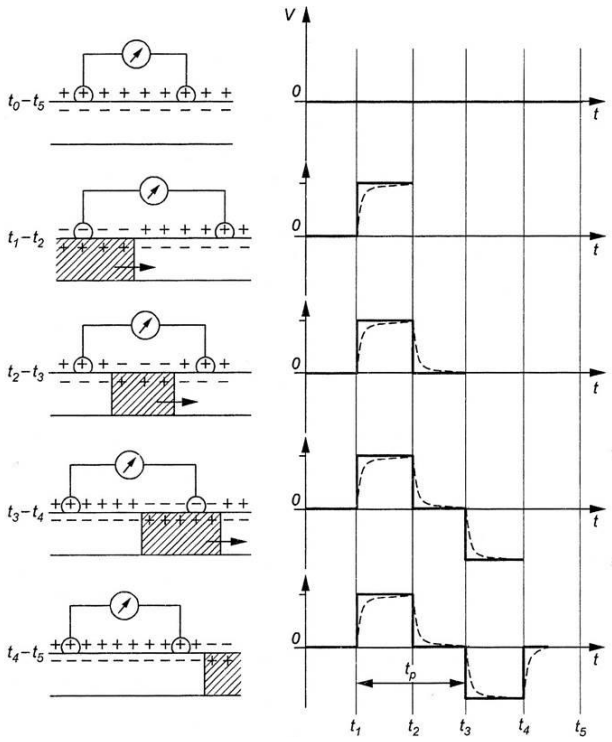
Rejestracja sygnałów elektrycznych z tkanek odbywa się zwykle za pomocą elektrody czynnej umieszczonej wewnątrz izolowanej komórki lub za pomocą elektrody umieszczonej na powierzchni komórki (ciała). Ten pierwszy sposób jest trudny do wykonania oraz bardzo ryzykowny w warunkach klinicznych. Jest zatem częściej stosowany w celach badawczych, gdyż umożliwia selekcję pożądanego sygnału spośród wielu sygnałów elektrycznych pochodzących z komórek i tkanek otaczających badany obszar. Schematycznie sposób rejestracji takich sygnałów przedstawiono na rysunku 3.6.



Rys. 3.6. Schematyczny przebieg potencjału czynnościowego mierzonego wewnątrz komórki [4].

Rejestracja sygnału z powierzchni komórki (ciała) jest prostsza technicznie. Wykorzystuje się w tej metodzie właściwości przewodzenia prądu przez płyny ustrojowe. Taki sposób pomiaru niestety powoduje pewną utrata selektywności zbieranych sygnałów, gdyż kształt sygnału zależy od wymiarów i miejsca przyłożenia elektrod pomiarowych (odprowadzających). Schematycznie przebieg potencjału czynnościowego zbieranego

z powierzchni komórek przedstawia rysunek 3.7. Napięcie mierzone między elektrodami przedstawia różnicę potencjałów zmiennych w czasie, występujących pod każdą z nich.

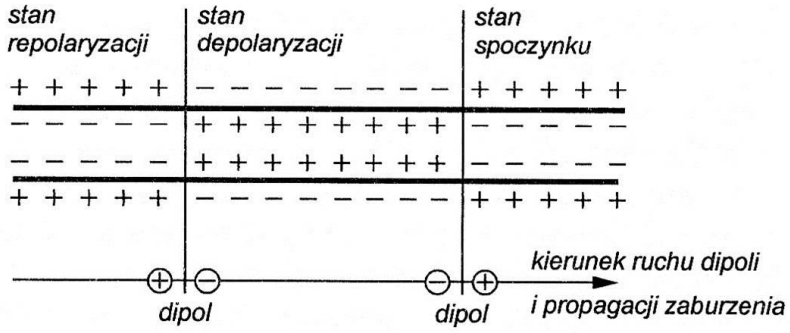


Rys. 3.7. Schematyczny przebieg potencjału czynnościowego mierzonego z powierzchni komórki [4].

Związek między potencjałem czynnościowym błony i różnicą potencjałów mierzoną na zewnątrz komórki opisywany jest za pomocą dwóch teorii: teorii interferencyjnej oraz teorii dipolowej.

Teoria interferencyjna zakłada, że elektrody zewnątrzkomórkowe odprowadzają napięcie, będące różnicą potencjałów występujących pod każdą z nich, zaś potencjał pod nimi jest podobny do słabszego (niż w przypadku gdy jedna z elektrod znajduje się wewnątrz komórki) sygnału rozchodzącego się wzdłuż błony komórkowej. Oba potencjały oddalone od siebie czasowo o czas propagacji, interferują ze sobą.

Teoria dipolowa zakłada natomiast, że potencjał czynnościowy jest równoważny potencjałowi powstałemu na skutek ruchu układu dipoli występujących na granicy między zdepolaryzowaną i repolaryzowaną częścią błony komórkowej (rys. 3.8.).



Rys. 3.8. Propagacja potencjału czynnościowego wg teorii dipolowej [4].

Przemieszczenie się depolaryzacji przejawia się jako ruch układu dipoli przesuwających się wzdłuż błony biegunem dodatnim w kierunku propagacji. Propagacja repolaryzacji polega na ruchu dipola biegunem ujemnym w kierunku propagacji. Obszar zewnątrzkomórkowy elektrycznie czynny (depolaryzacja) polaryzuje się ujemnie w stosunku do obszaru elektrycznie nieczynnego (stan spoczynkowy). Pod wpływem różnicy potencjałów, przez anizotropowe środowisko przewodzące utworzone przez tkanki i płyny ustrojowe, następuje przepływ prądu elektrycznego. Powstaje pole potencjału, które można wyznaczyć poprzez umieszczenie w tym polu elektrody aktywnej i zmierzenie napięcia względem dowolnie wybranego miejsca, w którym umieszcza się elektrodę odniesienia (miejsce odniesienia w potencjale zero).

Literatura

[1] red. F. Jaroszyk „*Biofizyka*", Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2011.
red. M. Bryszewska, W. Leyko „*Biofizyka dla biologów*", Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1997.

[2] G. Ślósarek „*Biofizyka molekularna*", Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2011.

[3] red. A. Pilawski „*Podstawy biofizyki"*, Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich, Warszawa 1977.

[4] G. Pawlicki „*Podstawy inżynierii medycznej*", Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej, Warszawa 1997.

[5] red. M. Bryszewska, W. Leyko „*Biofizyka dla biologów*", Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1997.

[6] J. A. Tuszyński, M. Kurzyński „*Introduction to molecular biophysics*", CRC Press, Boca Raton, London, New Yoork, Washington, D.C. 2003.

[7] P. F. Dillon „*Biophysics A physiological Approach*", Cambridge University Press, New York, 2012.

[8] ed. R. Splinter „*Handbook of Physics in Medicine and Biology*", CRC Press, Boca Raton, London, New Yoork, Washington, D.C. 2010.

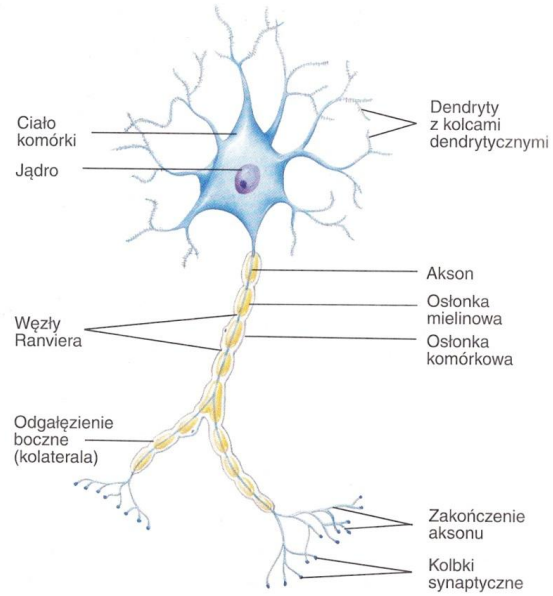
[9] P. Davidovits „*Physics in Biology and Medicine*", Academic Press Burlington, USA, 2008.

[10] E. P. Solomon, L. R. Berg, D. W. Martin, C. A. Villee „Biologia", MULTICO Oficyna Wydawnicza, Warszawa 1996.

Rozdział 4 Biofizyka tkanek

4.1 Tkanka nerwowa

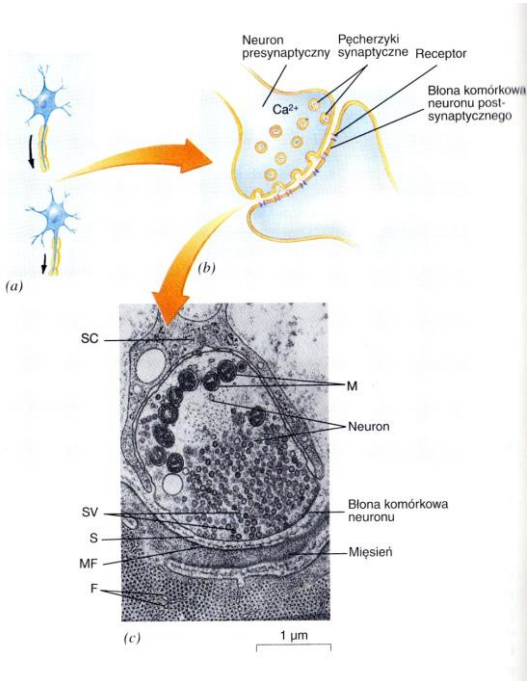
Tkanka nerwowa zbudowana jest z komórek nerwowych zwanych neuronami. Zbudowane są one z części centralnej zwanej ciałem neuronu, z którego wychodzą liczne wypustki nerwowe zwane dendrytami, długiej wypustki nerwowej zwanej aksonem, która jest włóknem nerwowym zakończonym wieloma rozgałęzieniami (rys. 4.1.). Niektóre aksony otoczone są lipidowo-białkową osłonką mielinową, która wykazuje słabą przepuszczalność dla jonów, w związku z czym słabo przewodzi impulsy elektryczne. W przewężeniach Ranviera oporność elektryczna aksonu spada, za pomocą tych miejsc następuje przekazywanie informacji między aksonem a środowiskiem zewnętrznym.



Rys. 4.1. Budowa komórki nerwowej – neuronu [6].

Komórki nerwowe mają za zadanie przekazywanie informacji zakodowanej w postaci impulsów nerwowych. Przewodzenie impulsów nerwowych przez neurony wiąże się z procesami elektrochemicznymi przebiegającymi w ich błonie komórkowej. Z tego powodu główną cechą tkanki nerwowej jest zdolność reagowania na bodźce zewnętrzne poprzez zmianę potencjału błon komórkowych neuronu. Potencjał spoczynkowy wnętrza komórki nerwowej wynosi -90 mV. Taki potencjał odpowiada bardzo wysokiej wartości natężenia pola elektrycznego w błonie równemu 90 000 Vcm^{-1} dla błony o grubości 10 nm, co oznacza polaryzację cząsteczek i uporządkowanie dipoli wchodzących w skład błony neuronu. Bodziec działając na błonę komórkową neuronu zmienia jego właściwości, a to wywołuje

potencjał czynnościowy. Do wnętrza neuronu napływają wówczas jony sodowe Na^+, na początku tylko tam gdzie zadziałał impuls, następnie obserwowany jest proces wyrównywania ładunków elektrycznych pomiędzy wnętrzem a otoczeniem (depolaryzacja błony) oraz rozszerzanie się fali depolaryzacji na sąsiednie odcinki błony komórkowej. Impulsem nerwowym nazywa się przesuwanie fali depolaryzacji od miejsca zadziałania bodźca na błonę komórkową aż do zakończenia neuronu. Impulsy z jednej komórki na drugą przekazywane są za pośrednictwem zakończeń aksonów – synaps (rys. 4.2.). Synapsy pokrywa błona presynaptyczna należąca do neuronu przekazującego impuls. Pomiędzy błoną presynaptyczną a błoną postsynaptyczną neuronu odbierającego impuls znajduje się szczelina synaptyczna. Wewnątrz synapsy znajdują się pęcherzyki synaptyczne, z których wydzielane są neurotrasmitery – substancje chemiczne zmieniające właściwości błony. Transmitery pośredniczą w przewodzeniu impulsów pobudzających. Pod ich wpływem jony sodu wnikają do wnętrza neuronu odbierającego impuls nerwowy czemu towarzyszy zmniejszanie się spoczynkowego potencjału ujemnego wewnątrz komórki w stosunku do potencjału na zewnątrz komórki. Jest to tzw. postsynaptyczny potencjał wzbudzający.



Rys. 4.2. Przewodzenie impulsów oraz budowa synapsy: a) fala depolaryzacji między neuronami, b) chemiczne przewodzenie impulsów przez synapsę, c) synapsa – zdjęcie z mikroskopu elektronowego (SV – pęcherzyki synaptyczne, S.C. – komórki Schwanna, M – mitochondria, S – szczelina synaptyczna, MF – błona włókna mięśniowego, F – włókna mięśniowe) [6].

Transmitery pobudzające powodują depolaryzację błony postsynaptycznej poprzez aktywację jonów sodu i otwarcie kanałów sodowych. Po około 0,5 ms następuje inaktywacja sodowa z jednoczesną aktywacją potasową, podczas której obserwuje się wychodzenie jonów

potasu z komórki w czasie procesu repolaryzacji. Transmiterami pobudzającymi są: acetylocholina, dopamina, adrenalina, noradrenalina, serotonina, histamina, asparginiany, glutaminiany.

Pod wpływem transmiterów hamujących powstaje postsynaptyczny potencjał hamujący, czyli hiperpolaryzacja błony postsynaptycznej. Transmitery hamujące powodują otwarcie dokomórkowych kanałów prądu chlorkowego i umożliwia wchodzenie jonów Cl^- do wnętrza neuronu. Zwiększa się wówczas ujemny potencjał w komórce nerwowej. Przyłączenie neurotransmitera do innego receptora powoduje natomiast otwieranie się kanałów odkomórkowego prądu potasowego i zamykanie się kanałów odpowiedzialnych za transport jonów wapniowych Ca^{2+}. Jednocześnie zwiększa się w neuronach stężenie przekaźników: inozytolotrifosforanu i diacyloglicerolu. Przykładem transmiterów hamujących jest kwas gamma-aminomasłowy oraz glicyna.

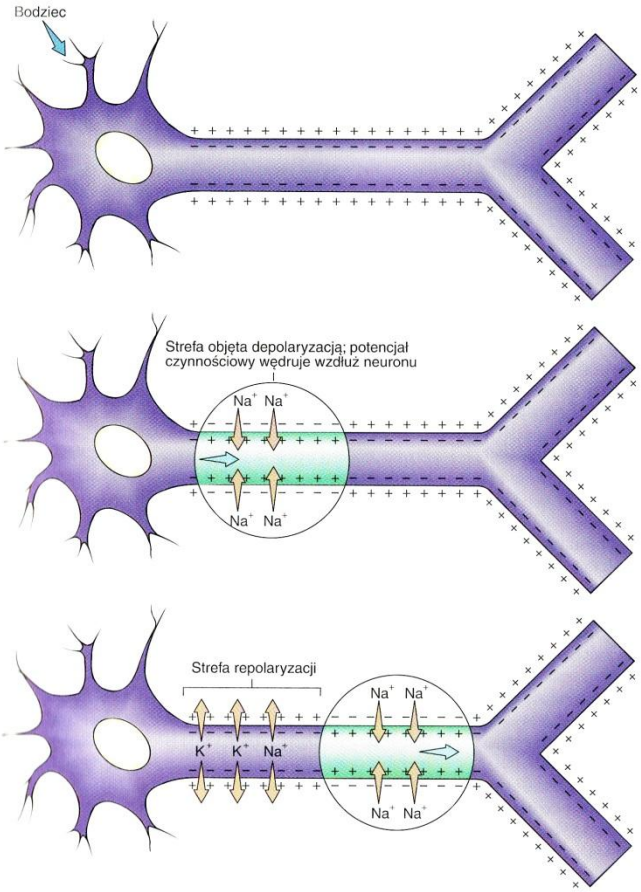
Przetwarzanie informacji w synapsach jest realizowane na dwa sposoby: poprzez mechanizmy sumowania w czasie oraz sumowania przestrzennego. Stopień depolaryzacji błony postsynaptycznej zależy od liczby cząsteczek transmitera wydzielanych w synapsach. Im jest ich więcej, tym większy jest stopień depolaryzacji błony. Stąd wniosek, że im więcej synaps jest pobudzanych w tym samym czasie w pewnej określonej przestrzeni trójwymiarowej, tym większa będzie depolaryzacja błony, co powoduje wzrost postsynaptycznego potencjału pobudzającego. Proces ten nazywany jest sumowaniem przestrzennym impulsów w obrębie neuronu. Jeżeli impulsy nerwowe przewodzone są przez synapsy w bardzo krótkich odstępach czasu (mniej niż 5 ms), to kolejne postsynaptyczne potencjały pobudzające nakładają się na siebie i coraz bardziej depolaryzują błonę komórkową – ten proces nazywany jest sumowaniem w czasie impulsów nerwowych.

Stosując model elektryczny komórki (rys. 3.4.) dla neuronu można zauważyć, że po zadziałaniu bodźca, zmniejsza się opór R_{Na}, a kondensator jest ładowany głównie poprzez ogniwo ΔV_{Na} zmienia się jednak znak ładowania kondensatora. Następnie opór R_{Na} rośnie, a maleje opór R_{K}, co powoduje przyspieszenie ładowania kondensatora.

Zmiany w przepuszczalności błony komórkowej neuronu wynikają z:

- dezorganizacji uporządkowania dipoli oraz zmian w polaryzacji cząsteczek w obszarze błony biologicznej;
- uwodnienia błony w czasie pobudzenia na skutek przesunięcia hydrofilowych reszt lipidów z zewnętrznej części błony do jej wnętrza, maleje wówczas opór błony o 100-200 razy;
- działania acetylocholiny na błonę komórkową.

Przewodzenie impulsów elektrycznych polega na przemieszczaniu się fali depolaryzacji wzdłuż neuronu. Potencjał czynnościowy, który pojawi się w danym miejscu aksonu, rozprzestrzenia się tak, że jest możliwa jego rejestracja w odległości nawet 1 m od tego miejsca. Posiada on w każdym miejscu aksonu taką samą amplitudę ale można go rejestrować z pewnym opóźnieniem czasowym. Rozprzestrzenianie się potencjału wynika z powstawania w neuronie lokalnych prądów jonowych, które powodują depolaryzację błony przed i za miejscem do którego dotarł potencjał czynnościowy. Prądy te są konsekwencją powstania lokalnego potencjału w otoczeniu miejsca w którym istnieje potencjał czynnościowy (rys. 4.3).

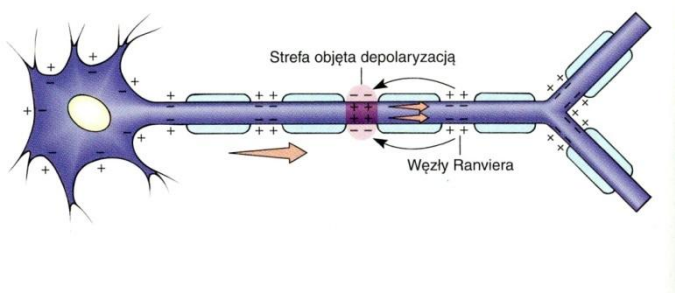


Rys. 4.3. Przewodzenie impulsu elektrycznego w aksonie [6].

Potencjał lokalny powoduje przepływ ładunków dodatnich z miejsca wnikania jonów sodowych oraz jonów dodatnich w kierunku przeciwnym. Przepływ ten powoduje wyrównanie się potencjału czynnościowego z potencjałem spoczynkowym w miejscu jeszcze niezdepolaryzowanym. Potencjał wówczas wzrasta z -90 mV do wartości ponadprogowej i jony sodowe mogą przez otwarte kanały wpływać do komórki. Prowadzi to do tego, że w obszarze za miejscem wytworzenia potencjału czynnościowego neuron jest w fazie

refrakcji bezwzględnej, aktywne są wówczas kanały potasowe, a nieaktywne kanały sodowe. W obszarze przed miejscem wytworzenia potencjału występuje natomiast aktywacja kanałów sodowych, powstaje więc tam potencjał czynnościowy.

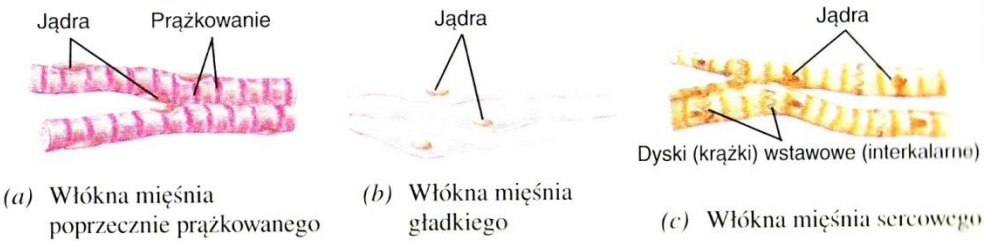
We włóknie nerwowym posiadającym otoczkę mielinową przewodzenie impulsów odbywa się skokowo między przewężeniami Ranviera, co zwiększa szybkość ich przemieszczania (rys. 4.4.). Dochodząc do końca włókna nerwowego impuls powoduje aktywację synaps, wydzielany jest neurotransmiter i impuls jest przekazywany dalej do innej komórki nerwowej.



Rys. 4.4. Przewodzenie impulsu w aksonach posiadających osłonkę mielinową [6].

4.2 Tkanka mięśniowa

Tkanka mięśniowa buduje prawie wszystkie narządy. Wyróżnia się jej trzy rodzaje: tkankę szkieletową, sercową oraz tkankę gładką (rys. 4.5.). Tkankę szkieletową i sercową tworzą mięśnie poprzecznie prążkowane. Mięśnie zbudowane są z włókien utworzonych z komórek mięśniowych.



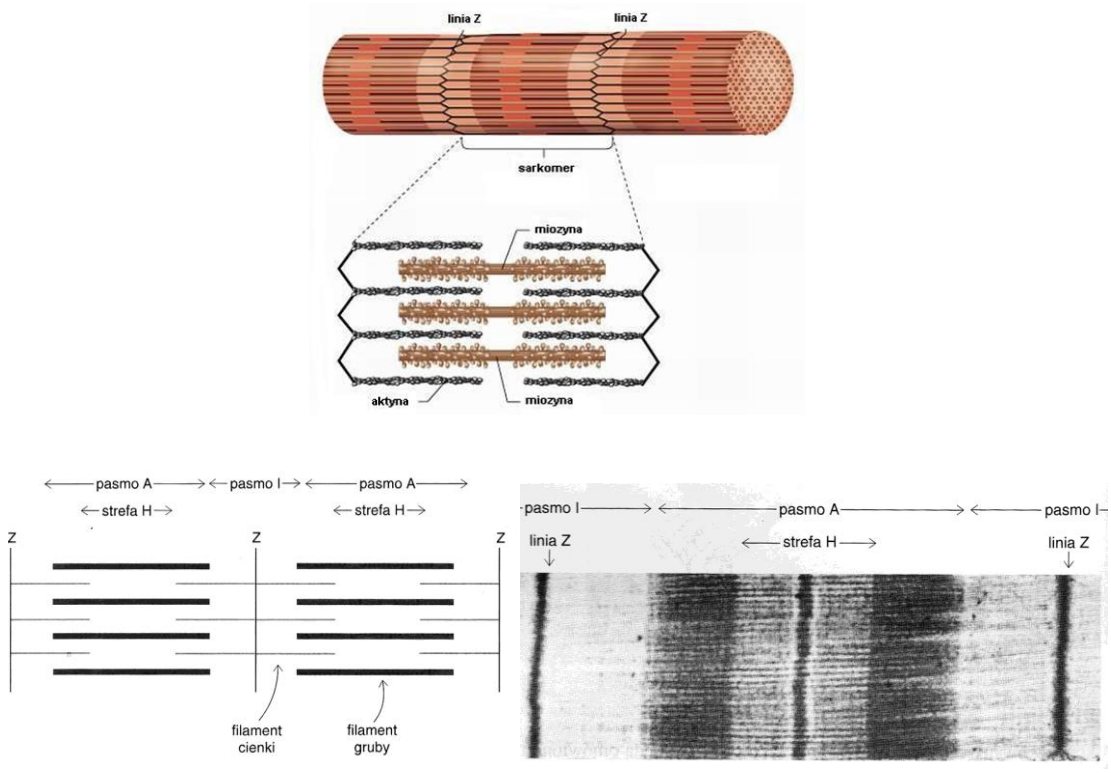
Rys. 4.5. Rodzaje komórek mięśniowych [6].

Rozważając mięsień jako materiał, można go zaklasyfikować do elastomerów – grupy polimerów wykazujących właściwości lepkosprężyste, które są związane z występowaniem w komórce mięśniowej białek o strukturze włóknistej. Najważniejszą cechą mięśnia jest jego zdolność do kurczenia się w odpowiedzi na działający bodziec. Skurcz jest skutkiem oddziaływań między białkami kurczliwymi budującymi mięsień.

4.2.1 Komórka mięśniowa poprzecznie prążkowana

Mięsień poprzecznie prążkowany zbudowany jest z wielojądrzastych komórek mięśniowych otoczonych elektrycznie pobudliwą błoną komórkową – sarkolemą. Wnętrze komórki wypełnia sarkoplazma i pęczki włókienek mięśniowych – miofibryli. Włókienko mięśniowe (miofibryla – 1μm) składa się z grubych (15 nm) i cienkich (9 nm) nitek kurczliwych białek, tzw. filamentów grubych i cienkich. Filamenty grube buduje białko miozyna, a cienkie aktyna oraz tropomiozyna. Na tropomiozynie osadzone są cząsteczki troponiny, które za pomocą podjednostek C, T i I łączą się z tropomiozyną (T), aktyną (I) oraz jonami wapniowymi (C). Cienki filament sąsiaduje z trzema filamentami grubymi, a każdy gruby otoczony jest przez sześć filamentów cienkich.

Sarkomer jest podstawową jednostką strukturalną miofibryli (rys. 4.6.). Pojedyncze włókienko mięśniowe złożone jest z 2000 – 100 000 sarkomerów. Występują w nim trzy krótsze odcinki tzw. prążki I, A i strefa H, o różnym upakowaniu łańcuchów polipeptydowych, co powoduje, że każdy z tych odcinków ma inny współczynnik załamania światła. W obrazie mikroskopowym takiego układu elementy te występują na przemian tworząc pasma jasne (I), o małym współczynniku załamania światła i ciemne (A), o dużym współczynniku załamania światła oraz centralny region pasma A, tzw. strefę H, która jest mniej gęsta niż pozostała część pasma. Pasmo I jest rozdzielone na dwie równe części przez bardziej gęstą linię Z, która stanowi granicę między dwoma sarkomerami. Za tworzenie prążków odpowiedzialne są filamenty cienkie i grube. Te pierwsze zakotwiczone są w linii Z i biegną równolegle do osi sarkomeru. Filamenty grube połączone są ze sobą w linii M i biegną równolegle do osi sarkomeru w kierunku linii Z. Prążek I obejmuje końcowe elementy dwóch sąsiednich sarkomerów. Każdy sarkomer jest otoczony kanalikami T (tzw. tubulami lub cewkami poprzecznymi), które są odpowiedzialne za przewodzenie impulsów nerwowych do wnętrza komórki. Pomiędzy kanalikami znajdują się zbiorniki i kanały siateczki sarkoplazmatycznej odpowiedzialne za wymianę jonów wapnia w komórce mięśniowej. Kanaliki T oraz siateczka sarkoplazmatyczna tworzą układ sarkotubularny.

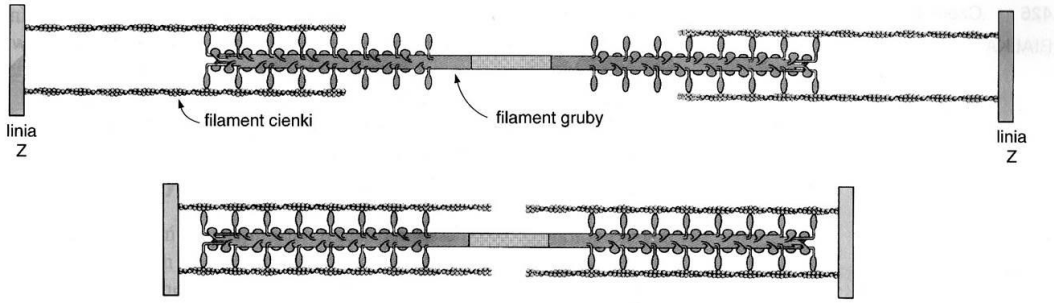


Rys. 4.6. Budowa sarkomeru [7].

Układ sarkotubularny to struktura uczestnicząca w przenoszeniu pobudzenia wewnątrz całej komórki mięśniowej. Miofibryle otacza siateczka sarkoplazmatyczna, która rozciąga się wzdłuż miofibryli prostopadle do cewek poprzecznych. W miejscach stykania się siateczki sarkoplazmatycznej z cewkami, siateczka tworzy zbiornik końcowy, w którym znajdują się jony wapnia. W czasie depolaryzacji błony komórkowej cewek poprzecznych następuje otwieranie się kanałów wolnego prądu jonów wapniowych. Jony wapniowe napływają pomiędzy nitki białek kurczliwych wiążąc się z podjednostką C troponiny.

Mechanizm skurczu mięśnia (rys. 4.7.) polega na pobudzeniu błony komórkowej (sarkolemy) przez bodziec docierający do niej za pośrednictwem aksonów komórek nerwowych. W wyniku tego procesu dochodzi do depolaryzacji błony komórkowej na skutek wydzielania w tym miejscu acetylocholiny. Następuje aktywacja kanałów dokomórkowego szybkiego prądu jonów sodowych. Depolaryzacja przesuwa się po powierzchni błony komórek mięśniowych i za pośrednictwem cewek poprzecznych obejmuje wnętrze komórki. Następuje uwolnienie jonów wapnia, które wiążą się z podjednostką C troponiny i zmniejszają jej powinowactwo do aktyny. Cząsteczki aktyny wówczas mogą zetknąć się z głowami cząsteczek miozyny. Dwie głowy cząsteczek miozyny tworzą mostek poprzeczny, który podczas skurczu łączy gruby filament miozynowy z cienkim aktynowym. Głowy

cząsteczek miozyny posiadają miejsce wiązania aktyny i ATP. Miozyna jest enzymem, ATPazą, hydrolizującym ATP do ADP i P_i. Wykorzystuje ono energię z hydrolizy ATP do poruszania się po filamentach aktynowych. Aktyna występuje w mięśniu w dwóch formach: globularnej (aktyna G) i polimerycznej o strukturze podwójnej spirali (aktyna F). Głowy cząsteczek miozyny stykają się z cząsteczkami aktyny hydrolizują ATP, co powoduje zmianę konformacji mostków poprzecznych i wracają do swojego poprzedniego położenia. Stykają się z dalej położonymi cząsteczkami aktyny i ponownie zmieniają swoją konformację. W ten sposób aktywowane jest ślizgowe nasuwanie się nitek cienkich aktyny na nitki grube miozyny, co powoduje skracanie się komórki mięśniowej i skurcz mięśnia. W czasie rozkurczu pompa wapniowa wciąga jony wapnia do zbiorników końcowych.



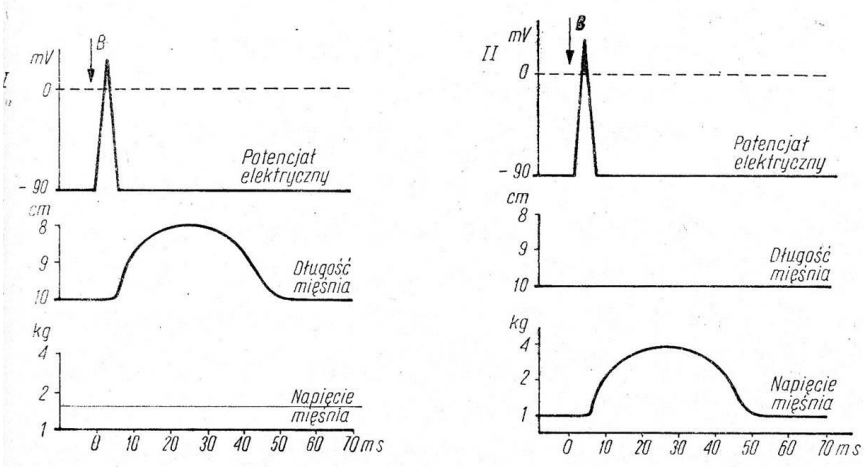
Rys. 4.7. Mechanizm skurczu mięśnia poprzecznie prążkowanego [7].

Pojedynczy bodziec o odpowiednim natężeniu powoduje depolaryzację błony komórkowej komórki mięśniowej na którą zadziałał. Konsekwencją tego jest skurcz całej komórki mięśniowej. Wyróżnia się następujące rodzaje skurczów mięśnia szkieletowego (rys. 4.8.):

- izotoniczny, podczas którego komórki mięśniowe skracają się i cały mięsień ulega skróceniu, a jego napięcie nie zmienia się;
- izometryczny, w przypadku którego obserwowany jest wzrost napięcia mięśnia bez zmian jego długości.

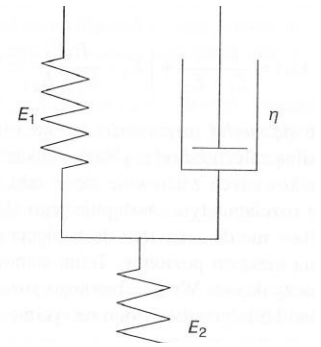
Występowanie nadprogowych bodźców z pewną częstotliwością powoduje powstawanie kolejnych skurczów mięśni. Przy pewnej częstotliwości bodźca (100 bodźców/sekundę dla mięśni szybko-kurczliwych, kilkanaście bodźców/sekundę dla mięśni wolno-kurczliwych) obserwowane jest zjawisko sumowania się skurczów pojedynczych w komórce mięśniowej, co prowadzi do skurczu tężcowego zupełnego lub niezupełnego. Skurcze tego typu są odpowiedzialne za ruch kończyn i całego ciała. Pobudzenie wszystkich komórek mięśniowych wywołuje skurcz maksymalny.

Każda komórka mięśniowa jest unerwiona przez komórki nerwowe skupione w jądrach ruchowych pnia mózgowia i rdzenia kręgowego. Jedna komórka nerwowa, jej wypustka biegnąca do mięśnia i wszystkie komórki mięśniowe przez nią unerwione stanowią jednostkę motoryczną. Siła skurczu mięśnia zależy od liczby jednostek motorycznych biorących udział w skurczu, częstotliwości pobudzania jednostek motorycznych oraz stopnia rozciągnięcia mięśnia przed skurczem.



Rys. 4.8. Rodzaje skurczu mięśnia: skurcz izotoniczny i izometryczny w wyniku zadziałania bodźca B [5].

Mięśnie poprzecznie prążkowane zachowują się jak ciała lepko-sprężyste. Do opisu właściwości ciał, w których przeważają elementy sprężyste stosuje się model reologiczny mięśni poprzecznie prążkowanych przedstawiony na rysunku 4.9. Jest to tak zwany model Burgersa lub ogólny model mechaniczny, który łączy cechy modelu Maxwella oraz Kelvina-Voighta.



Rys. 4.9. Model reologiczny mięśni poprzecznie prążkowanych [1].

Elementy tego modelu różnią się lepkością oraz wielkością modułów. W modelu tym właściwości sprężyste są przedstawione za pomocą sprężyny, natomiast właściwości lepkie za pomocą dławika złożonego z cylindra, w którym znajduje się ciecz lepka. Model Kelvina-Voighta opisuje właściwości ciał o przewadze elementów sprężystych. Naprężenie τ jest

sumą naprężeń wywołanych odkształceniem mięśnia – jego wydłużeniem w elemencie sprężystym o module sprężystości *E* oraz w elemencie lepkim o lepkości η:

$$\tau = E\gamma + \eta\frac{\mathrm{d}\gamma}{\mathrm{d}t},$$

gdzie γ jest odkształceniem względnym mięśnia, a $\frac{\mathrm{d}\gamma}{\mathrm{d}t}$ szybkością tego odkształcenia. Po przyłożeniu do mięśnia naprężenia τ_0 osiąga on całkowite wydłużenie *l* po czasie $t = \infty$. Zależność tego odkształcenia od czasu ma postać:

$$\gamma(t) = \frac{\tau_0}{E} - \frac{\tau_0}{E}e^{-\frac{t}{\lambda}} = \gamma_0\left(1 - e^{-\frac{t}{\lambda}}\right),$$

gdzie $\lambda = \eta/E$ jest czasem opóźnienia wydłużenia mięśnia. Model Maxwella opisuje zachowanie układów, w którym przeważają elementy lepkie. Szybkość odkształceń $\frac{\mathrm{d}\gamma}{\mathrm{d}t}$ w tym modelu jest sumą szybkości odkształceń w elemencie sprężystym o module sprężystości *E* oraz lepkim o lepkości η:

$$\frac{\mathrm{d}\gamma}{\mathrm{d}t} = \frac{1}{E}\frac{\mathrm{d}\tau}{\mathrm{d}t} + \frac{\tau}{\eta},$$

gdzie τ jest naprężeniem. Przyłożenie naprężenia powoduje natychmiastowe odkształcenie elementu sprężystego. Naprężenie początkowe τ wywołane w elemencie sprężystym (*E*) maleje do zera wraz z upływem czasu w elemencie lepkim (η):

$$\tau(t) = \tau_0 e^{-t/\lambda},$$

gdzie λ jest czasem relaksacji naprężeń ($\lambda = \eta/E$).

W przypadku modelu Burgersa naprężenie zanika zgodnie z równaniem:

$$\tau = \tau_\infty + (\tau_0 - \tau_\infty)e^{-t/\lambda},$$

gdzie $\lambda = \frac{\eta}{E_1+E_2}$. Moduł sprężystości zmienia się w czasie według wzoru:

$$E(t) = \frac{E_1E_2}{E_1 + E_2} + \left(E_2 - \frac{E_1E_2}{E_1 + E_2}\right)e^{-t/\lambda}.$$

Oznacza to, że jeśli mięsień poprzecznie prążkowany znajdował się w stanie rozciągniętym, to podczas jego skracania naprężenie szybko spada do pewnego napięcia granicznego, któremu odpowiada naprężenie spoczynkowe mięśnia.

Bierne rozciąganie mięśni powoduje wzrost modułu sprężystości w funkcji długości mięśnia, przy czym zmiany te są najpierw wolne, a potem szybkie. Krzywa naprężeniowo-odkształceniowa zatem będzie składała się z dwóch odcinków: pierwszego, w którym naprężenie rośnie wolno wraz ze wzrostem odkształcenia oraz drugiego, w którym rośnie szybko. Oba te zakresy różnią się zależnością naprężenia od temperatury.

Wzrost temperatury w mięśniu powoduje w odcinku pierwszym, przy stałej długości mięśnia, wzrost jego naprężenia, przy stałym naprężeniu jego skrócenie. W odcinku drugim obserwowane są procesy odwrotne. Oznacza to, że tkanki różnią się od siebie nie tylko właściwościami mechanicznymi ale i termodynamicznymi. W przypadku tkanek odpowiedzią na odkształcenie jest zmiana energii wewnętrznej *U* oraz entropii *S*. Zgodnie z I zasadą termodynamiki zmiana energii wewnętrznej wynosi:

$$\mathrm{d}U = \mathrm{d}Q + \frac{1}{\rho}\tau \mathrm{d}\gamma,$$

gdzie *Q* jest ciepłem, a ρ gęstością tkanki.

Z drugiej zasady termodynamiki wynika:

$$dQ = T\mathrm{d}S.$$

Można zatem na podstawie powyższych równań zapisać, że:

$$\mathrm{d}U = T\mathrm{d}S + \frac{1}{\rho}\tau \mathrm{d}\gamma,$$

a stąd wynika natomiast równanie:

$$\tau = \rho\left(\frac{\partial U}{\partial \gamma} - T\frac{\partial S}{\partial \gamma}\right)_T.$$

Równanie to pokazuje, że za wzrost naprężenia w tkankach spowodowane odkształceniem, związane jest ze wzrostem energii wewnętrznej układu oraz ze zmniejszaniem się jego entropii.

Wydłużając mięsień o Δl wykonujemy pracę równą:

$$W = F\Delta l.$$

Zgodnie z I zasadą termodynamiki:

$$W = \Delta U - Q,$$

ciepło *Q* można natomiast opisać zgodnie z II zasadą termodynamiki:

$$Q = T\Delta S,$$

stąd wynika zależność:

$$F = \frac{\Delta U}{\Delta l} - \frac{T\Delta S}{\Delta l}.$$

Dla $\Delta U = 0$ siła F rośnie tylko kosztem zmniejszania się entropii, czemu towarzyszy wydzielanie ciepła. Zmniejszanie się entropii jest związane z porządkowaniem się makrocząsteczek białkowych odpowiedzialnych za właściwości sprężyste mięśnia. Przy dużym rozciągnięciu mięśnia pochłaniane jest ciepło, co prowadzi do wzrostu energii wewnętrznej układu. Jest to związane ze zwiększeniem się odległości między makrocząsteczkami w mięśniu, co powoduje wzrost siły sprężystości.

Ciepło wydzielane podczas skurczu zostało zbadane przez Hilla. W 1938 roku otrzymał za swoje odkrycia nagrodę Nobla. Na ciepło wydzielane podczas skurczu składa się ciepło aktywacji, które wytwarzane jest podczas pojedynczego skurczu oraz ciepło skracania p proporcjonalnego do długości skrócenia mięśnia Δl. Po zakończeniu skurczu wydziela się dodatkowo ciepło odnowy, związane z procesami metabolicznymi odbywającymi się w mięśniu. Całkowita praca wykonywana przez mięsień podczas skurczu izotonicznego jest zatem równa:

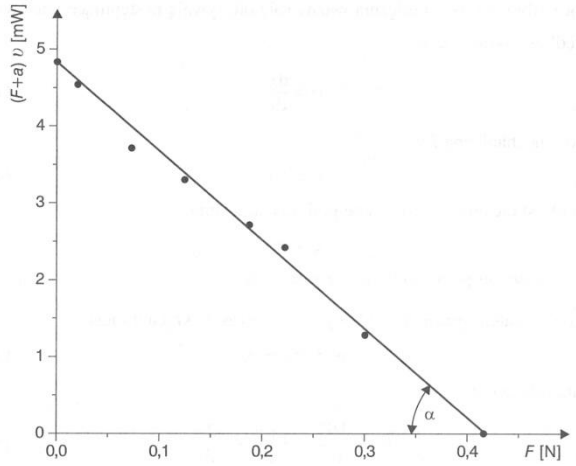
$$W_s = F\Delta l + a\Delta l,$$

gdzie pierwszy człon równania jest pracą zewnętrzną wykonaną przez mięsień, a drugi jest pracą wewnętrzną, która przekształcana jest na ciepło skracania p. Parametr a jest współczynnikiem proporcjonalności, który nie zależy od wielkości naprężenia mięśnia i wynosi a =0,035 J/cm^3).

Całkowita moc mięśnia wynosi:

$$P_s = \frac{\mathrm{d}W_s}{\mathrm{d}t} = F\frac{\mathrm{d}\Delta l}{\mathrm{d}t} + a\frac{\mathrm{d}\Delta l}{\mathrm{d}t} = Fv + av = v(F + a),$$

gdzie v jest prędkością skracania. Moc mięśnia maleje liniowo wraz ze wzrostem siły F (rys. 4.10.).



Rys.4.10. Moc mięśnia w funkcji obciążenia mięśnia krawieckiego żaby przy izotonicznym skracaniu [1].

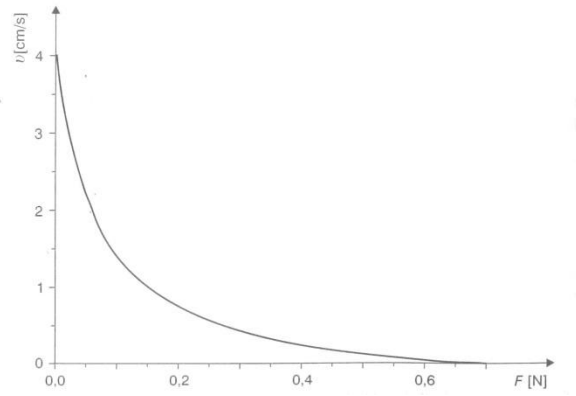
Zależność pomiędzy szybkością skracania a siłą Hill opisał następującym wyrażeniem:

$$v(F + a) = b(F_0 - F),$$

gdzie b jest współczynnikiem równym tangensowi nachylenia kąta α prostej, a F_0 jest maksymalną siłą występującą dla warunku $v = 0$. Równanie to można zapisać również w postaci:

$$(F + a)(v + b) = (F_0 + a)b = \text{const.}$$

Równanie to nosi nazwę równania Hilla. Znaleziony przez Hilla związek między prędkością skracania i siłą izotonicznego skracania mięśnia krawieckiego żaby przedstawia rysunek 4.11.



Rys. 4.12. Zależność szybkości skracania mięśnia krawieckiego żaby od siły izotonicznego skracania (wg badań Hilla) [1].

Sprawność energetyczną mięśnia można natomiast obliczyć korzystając z następującego wyrażenia:

$$\eta = \frac{Fv}{P_s}.$$

Mięśnie szkieletowe nie kurczą się spontanicznie. Sygnał do skurczu jest przekazywany z neuronu ruchowego przez synapsę nerwowo-mięśniową. Docierający do synapsy potencjał czynnościowy powoduje depolaryzację błony presynaptycznej i uwolnienie acetylocholiny, która następnie łączy się z receptorami znajdującymi się w błonie postsynaptycznej. Powoduje to otwarcie kanałów jonowych i napływ do wnętrza komórki mięśniowej jonów sodowych. Powoduje to depolaryzację błony komórkowej i wytworzenie w sarkolemie potencjału czynnościowego przenoszącego się wzdłuż kanalików T. Proces ten aktywuje skurcz mięśnia.

4.2.2 Komórka mięśniowa gładka

Komórka mięśniowa gładka posiada wrzecionowaty kształt i długość 15-500 μm. Nie posiada taka komórka jednostek kurczliwych, zastępują je nitki kurczliwe ułożone równolegle i biegnące wzdłuż osi długiej komórki. W czasie skurczu nitki te skracają się na skutek nasuwania się cząsteczek aktyny na cząsteczki miozyny. W mięśniach gładkich nie występuje troponina C. Jej funkcję przejmuje białko kalmodulina, która łączy się z napływającymi do wnętrza komórki jonami wapnia i aktywuje procesy fosforylacji łańcucha miozyny, dzięki którym ufosforylowana miozyna cyklicznie łączy się aktyną. Powoduje to przesuwanie cienkich nitek aktyny wzdłuż nitek miozyny. Spadek stężenia jonów wapnia powoduje defosforylację miozyny i rozkurcz mięśnia.

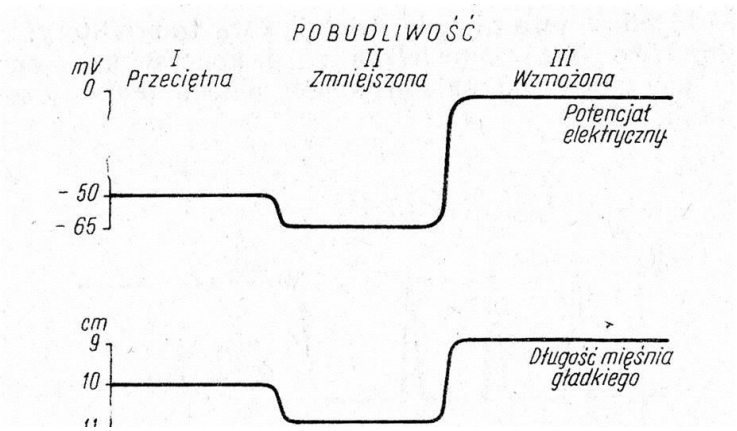
Wyróżnia się następujące rodzaje komórek mięśni gładkich:

- wielojednostkowe – komórki kurczą się niezależnie i pobudzenie nie przenosi się z jednej komórki na drugą (ściany naczyń krwionośnych, tęczówka);
- trzewne – stanowią warstwy lub pierścienie równolegle ułożonych komórek, w których pobudzenie przenosi się z jednej komórki na drugą (ściany przewodu pokarmowego, moczowody, pęcherz moczowy, macica).

Mięśnie gładkie mogą kurczyć się pod wpływem samoistnego pobudzenia (np. mięśnie macicy, przewodu pokarmowego). Mają one wówczas zdolność spontanicznego wytwarzania potencjałów czynnościowych, które są przenoszone między komórkami dzięki połączeniom szczelinowym. Skurcz może być również wyzwolony poprzez neurotransmitery (np. noradrenalina). Mogą one również powodować rozkurcz mięśni (np. acetylocholina).

Skurcz mięśni gładkich nie jest generowany poprzez impulsy nerwowe przewodzone za pośrednictwem synaps nerwowo-mięśniowych. Zakończenia nerwowe uwalniają neurotransmitery do przestrzeni między komórkami mięśniowymi. Są one następnie wiązane przez specjalne receptory błonowe znajdujące się na powierzchni komórek.

Wnętrze komórek mięśniowych ma ujemny potencjał elektryczny (około -50 mV). Wzrost pobudliwości wyraża się długotrwałym zmniejszeniem się ujemnego potencjału wewnątrzkomórkowego – spowodowane zmianą właściwości błony komórkowej, czyli depolaryzacją na skutek zwiększonej przepuszczalności dla jonów sodu. Komórka o zmniejszonej pobudliwości ma wnętrze bardziej ujemne (-65 mV). Spowodowane jest to ucieczką jonów potasu z wnętrza komórki lub utrudnionym wchodzeniem jonów sodu do komórki, czyli występowaniem procesu hiperpolaryzacji. Jest ona wówczas w stanie rozkurczu. Długość mięśnia gładkiego oraz potencjał elektryczny wnętrza komórki mięśniowej mięśnia gładkiego dla różnych pobudliwości przedstawia rysunek 4.12.



Rys. 4.12. Pobudliwość mięśniowa [5].

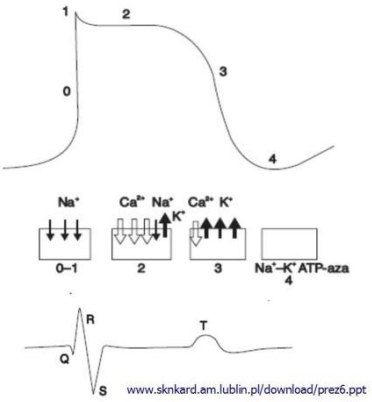
Rozciąganie mięśnia gładkiego można przedstawić za pomocą reologicznego modelu Maxwella, który opisuje zachowanie układów, w którym przeważają elementy lepkie. Oznacza to, że mięsień taki jest podatny na rozciąganie. Sprawdza się to w przypadku na przykład mięśni pęcherza moczowego.

4.2.3 Mięsień sercowy

Mięsień sercowy składa się z dwóch rodzajów mięśni: przedsionków i komór. Mięśnie te są oddzielone od siebie pierścieniami włóknistymi. Budową mięsień sercowy przypomina mięsień poprzecznie prążkowany, natomiast pod względem czynnościowym, trzewny mięsień gładki. Zbudowany jest z komórek mięśniowych, które wyposażone są we włókienka mięśniowe – podstawowe elementy kurczliwe (sarkomery). Błony komórkowe sąsiednich komórek w miejscach występowania prążków Z ściśle do siebie przylegają tworząc pozazębianą błonkę – wstawkę. Dzięki wstawkom pobudzenie przenosi się z jednej komórki na drugą. Odpowiada ten mięsień na bodziec skurczem maksymalnym. Potencjał spoczynkowy mięśnia wynosi -80 mV.

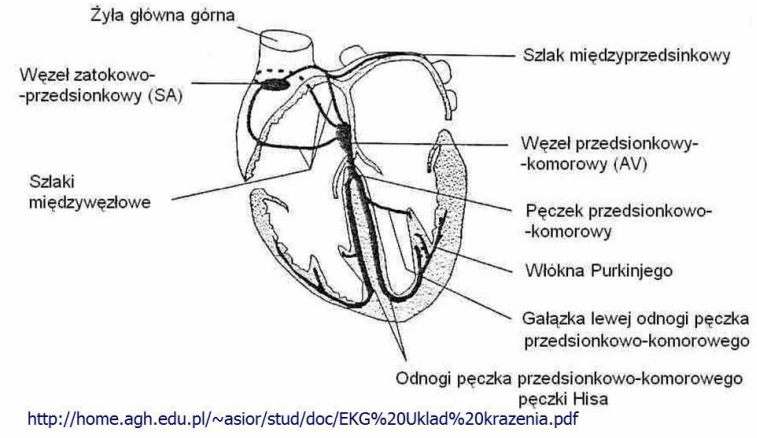
W czasie pobudzenia komórek mięśnia komór serca występuje czynnościowy potencjał złożony z 4 faz (rys. 4.13.):

- faza „0” – szybka depolaryzacja – dokomórkowy szybki prąd jonów sodowych;
- faza „1” – repolaryzacja – odkomórkowy prąd potasowy;
- faza „2” – stała depolaryzacja przez 200 ms – równowaga między dokomórkowym prądem wapniowym a dokomórkowym prądem potasowym;
- faza „3” – powrót do potencjału spoczynkowego – odkomórkowe prądy jonów dodatnich (głownie potasowych).

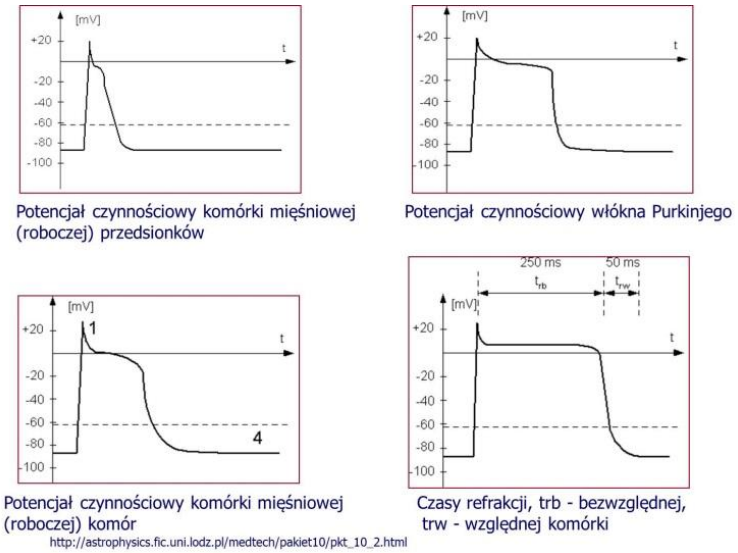


Rys. 4.13. Potencjał czynnościowy serca.

W mięśniu sercowym komórki układu nerwowego i komórki mięśniowe nie są połączone synapsami. Neurotransmitery, podobnie jak w mięśniach gładkich, są uwalniane przez zakończenia nerwowe komórek nerwowych do przestrzeni zewnątrzkomórkowej i powodują reakcję skurczową. Sygnałem do skurczu jest impuls pochodzący z układu bodźco-przewodzącego serca. Depolaryzacja sarkolemy aktywuje kanały wapniowe. Pod wpływem gradientu stężeń jony wapniowe napływają do cytoplazmy i przenoszą pobudzenie z sarkolemy na błonę siateczki sarkoplazmatycznej. Obecność wapnia w pobliżu białek kurczliwych inicjuje mechanizm skurczu. Komórki układu przewodzącego serca charakteryzuje brak prążkowania. Tworzą one węzeł zatokowo przedsionkowy, przedsionkowo-komorowy, pęczek przedsionkowo-komorowy zakończony włóknami Purkinjego (rys. 4.14.). Mają one zdolność do samoistnego i rytmicznego pobudzania się. Wywołane jest to powolną depolaryzacją błony komórkowej występującą pomiędzy potencjałami czynnościowymi. Stopniowo zanikający prąd jonów potasowych i nasilenie dokomórkowego prądu jonów wapniowych aż do osiągnięcia potencjału progowego wyzwala potencjał czynnościowy (rys. 4.15.).

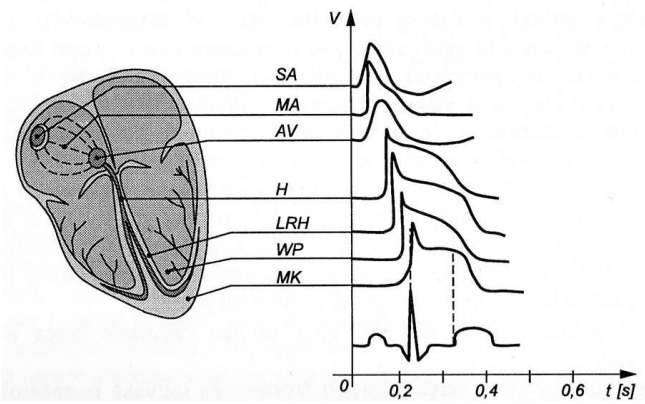


Rys. 4.14. Układ bodźco-przewodzący serca.



Rys. 4.15. Potencjał czynnościowy mięśnia sercowego.

Pobudzenie powstałe w węźle zatokowo-przedsionkowym rozprzestrzenia się w sposób sekwencyjnie uporządkowany drogą układu bodźcowo-przewodzącego na cały mięsień serca powodując jego skurcz (rys. 4.16). W mięśniu sercowym transmisja sygnału odbywa się bezpośrednio od jednej komórki do drugiej przez specjalne kanały zwane połączeniami szczelinowymi. Fala pobudzenia zapoczątkowana w węźle zatokowo-przedsionkowym przenosi się wzdłuż ścian przedsionka do węzła przedsionkowo-komorowego z prędkością około 1m/s. Tu następuje spowolnienie pobudzenia, które umożliwia skurcz przedsionków przed pobudzeniem komór. Pęczek Hisa jego odnogi i włókna Purkinjego przewodzą pobudzenie dalej obwodowo z prędkością 2-4 m/s do mięśni komorowych. Dalej komórki mięśniowe z prędkością 0,3 m/s przekazują pobudzenie na resztę mięśnia komorowego.



Rys. 4.16. Rozprzestrzenianie się pobudzenia w mięśniu sercowym [4].

4.3 Tkanka łączna

Tkanka łączna w organizmach żywych zapewnia łączność między wszystkimi innymi tkankami. Pełni ona w organizmie funkcje podporowe, łączy i utrzymuje w odpowiednim miejscu inne tkanki, uczestniczy również w transporcie substancji odżywczych i tlenu, a także uczestniczy w procesach obronnych organizmu oraz gojenia ran. Ze względu na duży udział płynów w jej składzie (około 75%) wpływa również na gospodarkę wodno-elektrolitową organizmu. Tkanka łączna zbudowana jest z:

- niewielu komórek odpowiedzialnych za powstawanie i odnowę tej tkanki;
- substancji międzykomórkowej wypełniającej przestrzenie między komórkami;
- składników włóknistych – włókien kolagenowych, elastycznych i relikulinowych (siateczkowych) rozproszonych w istocie międzykomórkowej.

Głównym składnikiem wszystkich rodzajów włókien występujących w tkance łącznej jest kolagen. Podstawową jednostką strukturalną tego białka jest tropokolagen produkowany przez fibroblasty, który następnie polimeryzuje do kolagenu. Tropokolagen składa się z trzech, zwiniętych w lewoskrętną helisę łańcuchów polipeptydowych (dwa z nich mają identyczny skład aminokwasowy, trzeci odmienny), które wspólnie tworzą potrójną helisę. Aminokwasami dominującymi w kolagenie są glicyna oraz prolina, zawiera on także hydrokslizynę oraz hydroksyprolinę. W wyniku równoległego ułożenia cząsteczek tropokolagenu, przesuniętych względem siebie o ¼ swojej długości oraz o końcach oddalonych od siebie o około 40 nm, powstają struktury zwane fibrylami, które wykazują prążkowanie. Pęczki fibryli o średnicy 50-400 μm tworzą włókna kolagenowe.

Włókna elastyczne składają się z:

- elastyny, białka zawierającego dużo glicyny i proliny, mało hydroksyproliny, którego podstawową jednostką strukturalną jest tropoelastyna;

– mikrofibryl o średnicy 10-12 nm, zawierających włókniste glikoproteidy.

Włókna elastyczne wykazują właściwości sprężyste. Jest to związane ze specyficzną budową elastyny, w której między łańcuchami tropoelastyny występują wiązania poprzeczne. Dodatkowo, na etapie powstawania włókna tego rodzaju, miofibryle otaczają elastynę. Włókna elastyczne tworzą w tkankach trójwymiarowe sieci poprzeplatane włóknami kolagenowymi, co zapobiega rozrywaniu tkanki pod wpływem naprężeń. Występują zatem w ścianach naczyń krwionośnych, więzadłach, skórze i chrząstkach.

Włókna relikulinowe zbudowane są z kolagenu, składają się z około 10 fibryli o średnicy około 20 nm każda. Tworzą one siatkę, która ma za zadanie osłaniać włókna mięśniowe, nerwowe, naczynia krwionośne i limfatyczne oraz gruczoły.

Tkanka łączna wykazuje właściwości elastyczne. Są one związane z obecnością w niej włókien kolagenowych oraz elastynowych. Włókna te różnią się modułem sprężystości. Dla kolagenu wynosi on około 10^7 N/m^2, natomiast dla elastyny 10^6 N/m^2. Włókna te w różny sposób reagują na odkształcenie. Rozciąganie tkanki przy dużych obciążeniach powoduje wydłużanie włókien kolagenowych, zaś przy małych włókien elastynowych. W zależności od wzajemnych proporcji występowania kolagenu i elastyny w danym typie tkanki zmieniają się jej właściwości biomechaniczne.

Ścięgna charakteryzują się dużą wytrzymałością na zerwanie w kierunku podłużnym, bliską wytrzymałości stali. Włókna kolagenu leżą w nich wzdłuż osi ścięgna, równolegle do siebie.

Skóra wykazuje dużą elastyczność oraz wytrzymałość mechaniczną w dwóch kierunkach w płaszczyźnie skóry, mniejszą w kierunku poprzecznym. Włókna kolagenowe są w niej ułożone w różnych kierunkach i w wielu warstwach.

Chrząstki zawierają znaczne ilości substancji międzykomórkowej w której chaotycznie rozłożone są cienkie włókna kolagenowe. Dzięki temu tkanka ta jest elastyczna i posiada niski współczynnik tarcia.

Kość jest sztywna i twarda oraz odporna na rozerwanie. Włókna kolagenowe w niej przebiegają wzdłuż linii naprężeń, a między nimi występują kryształy fosforanu wapnia tworząc blaszkowatą/beleczkowatą strukturę. Kryształy fosforanów nadają kości twardość i sztywność, włókna kolagenowe wpływają natomiast na jej odporność na rozerwanie. Wytrzymałość kości nie jest wielkością stałą. Zmienia się ona pod wpływem obciążeń na nią działających. Odpowiada za to struktura beleczkowa tej tkanki, która w warunkach równowagi dostosowuje się do kierunków naprężeń w niej występujących (prawo Wolfa).

Zgodnie z prawem Hooke'a, wytrzymałość (równa sile sprężystości F_s) rośnie wprost proporcjonalnie do powierzchni *A*:

$$F_s = E\frac{\Delta l}{l_0}A,$$

gdzie l_0 jest długością początkową. Obciążenie (*Q*), rozumiane jako ciężar ciała, rośnie natomiast wprost proporcjonalnie do jego objętości (*V*):

$$Q = \gamma V,$$

współczynnikiem proporcjonalności w tym równaniu jest ciężar właściwy ciała. Oznacza to, że w warunkach nierównowagowych (na przykład przy braku aktywności), przy szybko rosnących obciążeniach tkanka kostna będzie trudniej się do nich przystosowywała, a przy braku dostatecznych obciążeń może zanikać lub tracić swoją wytrzymałość. W trakcie zmian natężenia i szybkości naprężeń działających na tkankę kostną, w kości aktywowane są procesy jej wewnętrznych przeobrażeń, tzw. procesy remodelingu, czyli wzmacniania, osłabiania, mineralizowania, demineralizacji, sorpcji i resorpcji. Zjawiska zachodzące w tkance kostnej podczas jej obciążenia można opisać za pomocą dwóch efektów: chemicznego i piezoelektrycznego. Efekt chemiczny związany jest z obecnością wapnia w kości. Podczas cyklicznych zmian naprężenia następuje koncentracja wapnia, co wpływa na efektywność reakcji chemicznych, w których on uczestniczy. Efekt piezoelektryczny tłumaczy pojawienie się różnicy potencjałów w układzie, który podczas obciążenia ulega deformacji. W obszarze, w którym obserwowany jest ten proces generowane są potencjały o różnych znakach, ujemny w części ściśniętej, dodatni w części rozciągniętej. Pojawia się wówczas różnica potencjałów, która jest efektem migracji głównie jonów wapnia i ich przegrupowaniem w układzie kostnym. Różnica ta jest proporcjonalna do naprężenia.

W układzie kostnym mierzone moduły sprężystości rosną wraz ze wzrostem szybkości odkształcenia, przy jednoczesnym zmniejszaniu się maksymalnego wydłużenia względnego. Jest to spowodowane obecnością w tkance struktur o właściwościach lepkich.

Praca wykonana podczas odkształcenia sprężystego magazynowana jest w postaci energii potencjalnej sprężystości:

$$E_p = \frac{EA\Delta l^2}{2l_0},$$

gdzie *A* jest polem przekroju poprzecznego lub ze względu na anizotropię tkanki kostnej, w w postaci gęstości energii potencjalnej sprężystości:

$$\rho_p = \frac{E\varepsilon^2}{2} = \frac{\tau^2}{2E},$$

gdzie $\varepsilon = \frac{\Delta l}{l_0}$ i jest wydłużeniem względnym, E modułem sprężystości, a τ naprężeniem. Lokalny wzrost gęstości energii potencjalnej sprężystości w kości może zatem powodować dyslokacje struktur kostnych, a w konsekwencji jej osłabienie i urazy.

Największą wytrzymałość kość wykazuje na ściskanie i zginanie, mniejszą na rozciąganie, a najmniejszą na skręcanie.

Wyróżnia się następujące typy tkanki łącznej:

- zarodkową (embrionalną);
- wyspecjalizowaną:
    - tkanka łączna siateczkowata, zbudowana z włókien siateczkowatych, zapewnia podporę dla narządów;
    - tkanka tłuszczowa zawiera komórki tłuszczowe, które magazynują tłuszcz, jako źródło energii, stanowi izolację cieplną oraz ochronę mechaniczną;
- właściwą:
    - tkanka łączna właściwa luźna – wypełnia wolne przestrzenie między narządami, służy jako zbiornik płynów i soli mineralnych, jest częścią warstwy podskórnej, jest elastyczna dzięki niewielkiej zawartości włókien;
    - tkanka łączna właściwa zbita – składa się głównie z włókien kolagenowych, dzięki temu jest bardzo wytrzymała, dzieli się ją na:
        - ✓ tkankę łączną ścięgnistą, zbudowaną wyłącznie z równolegle ułożonych włókien kolagenowych oraz z występującymi między nimi włóknami fibroblastów, występuje ścięgnach i więzadłach;
        - ✓ tkankę łączną sprężystą, dominują w niej włókna sprężyste zbudowane z elastyny, buduje błony w naczyniach krwionośnych, tchawicy i oskrzelach;
        - ✓ tkankę łączną splotowatą, zawierającą niewielką ilość włókien sprężystych, występuje w okostnej i ochrzęstnej;
- szkieletową:
    - tkanka chrzęstna, zbudowana z komórek chrzęstnych zwanych chondrocytami, jest twarda i sprężysta, gdyż chondrocyty wydzielają zbitą, sprężystą istotę podstawową oraz włókna kolagenowe, które ją wzmacniają, występuje w małżowinie usznej, nosie, żebrach, krtani, spojeniu łonowym, kręgach;
    - tkanka kostna, zbudowana jest głównie z blaszkowatej istoty podstawowej (z włóknami kolagenowymi) oraz zatopionymi w niej kryształami

hydroksyapatytów, występują w niej również komórki kościotwórcze (osteoblasty), komórki kostne (osteocyty) oraz komórki kościogubne (osteoklasty), tkanka ta buduje szkielet, ma zatem funkcje podporowe i ochronne, magazynuje wapń, dzięki obecności substancji nieorganicznych jest 6-7 razy bardziej wytrzymała niż tkanka chrzęstna;

- krew i limfa, są tkankami płynnymi, pełniącymi funkcje odżywczo-transportowe i odpornościowe, przeważa w tej tkance substancja międzykomórkowa, w której znajdują się wyspecjalizowane komórki.

Literatura

[1] red. F. Jaroszyk „*Biofizyka*", Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2011.
red. M. Bryszewska, W. Leyko „*Biofizyka dla biologów*", Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1997.

[2] G. Ślósarek „*Biofizyka molekularna*", Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2011.

[3] red. A. Pilawski „*Podstawy biofizyki"*, Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich, Warszawa 1977.

[4] G. Pawlicki „*Podstawy inżynierii medycznej*", Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej, Warszawa 1997.

[5] W. Z. Traczyk „*Fizjologia człowieka w zarysie*", Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 1997.

[6] E. P. Solomon, L. R. Berg, D. W. Martin, C. A. Villee „Biologia", MULTICO Oficyna Wydawnicza, Warszawa 1996.

[7] L. Stryer „Biochemia", Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2000.

[8] J. A. Tuszyński, M. Kurzyński „*Introduction to molecular biophysics*", CRC Press, Boca Raton, London, New Yoork, Washington, D.C. 2003.

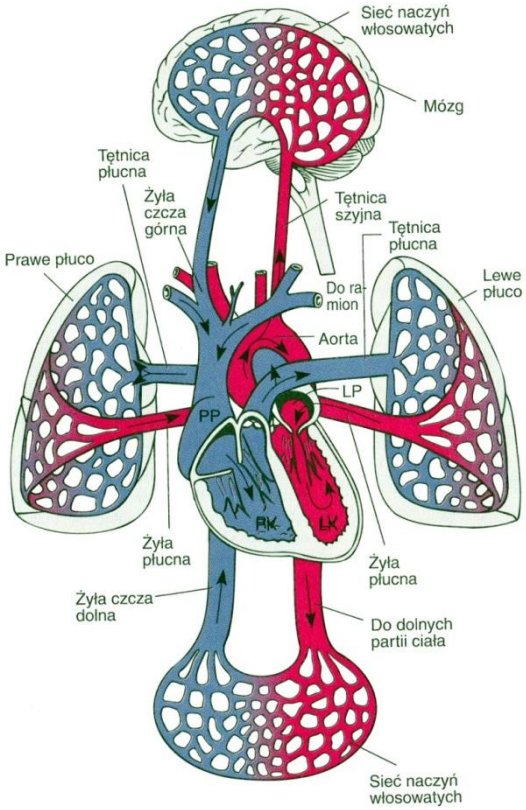
[9] P. F. Dillon „*Biophysics A physiological Approach*", Cambridge University Press, New York, 2012.

[10] I. P. Herman „*Physics of the Human Body*", Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2007.

Rozdział 5 Biofizyka narządów

5.1 Biofizyka układu krążenia

Układ krążenia jest ważny z punktu widzenia jego funkcji transportowych w organizmie. Transportuje on substancje odżywcze i tlen do wszystkich komórek ciała, produkty przemiany materii do narządów wydalniczych, hormony do tkanek docelowych. Pośredniczy także w utrzymaniu równowagi płynów ustrojowych, uczestniczy w reakcjach obronnych organizmu oraz utrzymaniu stałej temperatury ciała. Układ krążenia składa się z krwi, narządu tłoczącego krew, czyli serca oraz systemu naczyń krwionośnych, w których krąży krew. Krew w układzie krwionośnym krąży w dwóch obwodach zamkniętych: płucnym (małym) i ustrojowym (dużym) (rys. 5.1.). Krążenie płucne łączy serce z płucami, natomiast krążenie ustrojowe łączy serce z narządami, tkankami i komórkami. Krew z lewej komory serca płynie krążeniem dużym do prawego przedsionka, stąd dalej do prawej komory i krążeniem małym do lewego przedsionka. Transport krwi odbywa się za pomocą trzech rodzajów naczyń krwionośnych: tętnic odprowadzających krew z serca do tkanek za pomocą naczyń włosowatych, które następnie łączą się tworząc żyły doprowadzające krew do serca.



Rys 5.1. Schemat układu krążenia [11].

5.1.1 **Opór naczyniowy przepływu krwi**

Przepływ krwi w układzie krwionośnym jest wywołany różnicą ciśnień między układem tętniczym i żylnym utrzymywanym przez pracę pompy ssąco-tłoczącej, czyli serca. Ciśnienie krwi w aorcie zmienia się od około 120 mmHg w stosunku do ciśnienia atmosferycznego podczas skurczu, do około 70 mmHg podczas rozkurczu serca. Średnie ciśnienie panujące w aorcie wynosi około 100 mmHg. W żyle głównej (w miejscu ujścia do prawego przedsionka) ciśnienie to wynosi 10 mmHg. Oznacza to, że krew w obiegu dużym płynie pod wpływem różnicy ciśnień równej 90 mmHg. Ciśnienie w tętnicy płucnej waha się od 8 mmHg przy rozkurczu do około 22 mmHg przy skurczu. Średnia wartość ciśnienia zatem wynosi 15 mmHg. W żyle płucnej doprowadzającej krew do lewego przedsionka, ciśnienie krwi waha się wokół wartości 7 mmHg. W krążeniu płucnym zatem krew płynie pod wpływem średniej różnicy ciśnień wynoszącej 8 mmHg. Ze względu na obecność pola grawitacyjnego, dla osoby w pozycji pionowej, ciśnienie krwi w naczyniach położonych poniżej serca, wywołane pracą serca wzrasta o wartość ciśnienia hydrostatycznego $p = \rho g h$, gdzie h jest odległością między poziomem serca, a określonym miejscem w układzie krążenia, ρ gęstością krwi, a g przyspieszeniem ziemskim. W naczyniach położonych powyżej serca ciśnienie zmniejsza się proporcjonalnie do ich odległości od serca.

Do opisu krążenia krwi w układzie krwionośnym można zastosować prawa hydrodynamiki: prawo ciągłości strumienia oraz prawo Bernulliego. Przepływ cieczy definiuje się parametrem zwanym przepływem *J*. Jest to stosunek objętości ΔV cieczy przepływającej przez poprzeczny przekrój strumienia do czasu Δt przepływu:

$$J = \frac{\Delta V}{\Delta t}.$$

Zgodnie z prawem ciągłości strumienia (przez dowolny przekrój poprzeczny przewodu, w tym samym czasie, przepływa ta sama objętość cieczy), natężenie przepływu jest stałe, niezależne od przekroju przewodu:

$$J_1 = J_2 = \cdots \text{const.}$$

Korzystając z definicji przepływu, prawo ciągłości można zapisać w postaci:

$$A_1 v_1 = A_2 v_2 = \text{const.}$$

Iloczyn pola przekroju przewodu A i prędkości przepływu cieczy v jest wartością stałą. Prędkość przepływu cieczy jest więc odwrotnie proporcjonalna do przekroju przewodu. Jeżeli w przewodzie powierzchnia przekroju ulega zmianie, to zmieniać się będzie również energia

kinetyczna układu, co wymaga wykonania pracy, a na końcach przewodu musi istnieć różnica ciśnień, która utrzymuje ruch cieczy. Można zatem zapisać następujące równania:

$$F_1 \Delta l_1 = F_2 \Delta l_2 \text{ lub } p_1 \Delta V = p_2 \Delta V,$$

gdzie objętość ΔV, długość Δl, ciśnienie p oraz siła F charakteryzują objętościowe elementy przewodu 1 i 2 o różnym przekroju poprzecznym. Ciecz przepływając z większego przekroju A_1 do mniejszego A_2 zwiększa swoją energię kinetyczną o wartość

$$\frac{1}{2}mv_2^2 - \frac{1}{2}mv_1^2,$$

co jest wynikiem wykonania przez układ pracy

$$W_1 = p_1 \Delta V$$

przy przemieszczeniu cieczy o objętości ΔV przy ciśnieniu i p_1 oraz pracy

$$W_2 = -p_2 \Delta V,$$

wykonanej przeciwko ciśnieniu p_2. Można zatem zapisać, że zmiana energii kinetycznej będzie równa wykonanej pracy:

$$\frac{1}{2}mv_2^2 - \frac{1}{2}mv_1^2 = p_1 \Delta V - p_2 \Delta V.$$

Po wstawieniu do powyższego równania gęstości cieczy:

$$\rho = \frac{m}{\Delta V},$$

otrzymuje się prawo Bernulliego

$$p = p_1 + \frac{1}{2}\rho v_1^2 = p_2 + \frac{1}{2}\rho v_2^2 = \cdots = \text{const.},$$

gdzie p_1 i p_2 oznaczają ciśnienia statyczne działające na ściany przewodu o powierzchniach przekroju A_1 i A_2, a $\frac{1}{2}\rho v_1^2$ oraz $\frac{1}{2}\rho v_2^2$ są ciśnieniami dynamicznymi. Z prawa tego można wyznaczyć różnicę ciśnień $\Delta p = p_2 - p_1$, która utrzymuje ruch cieczy w przewodzie.

W przypadku obwodu krążenia należy w analizie przepływu krwi uwzględnić warunki dodatkowe:

- $J = \sum J_n$ – natężenie strumienia w przewodzie doprowadzającym jest równe sumie natężeń w poszczególnych rozgałęzieniach, gdyż naczynia krwionośne rozgałęziają się;
- $A = \sum A_n$ – powierzchnia przekroju strumienia jest sumą pól odpowiednich przekrojów wszystkich naczyń.

Prawo ciągłości strumienia i prawo Bernulliego można stosować do układu krążenia z pewnymi zastrzeżeniami, gdyż jest ono prawdziwe tylko dla cieczy nieściśliwych, poruszających się ruchem laminarnym w przewodach sztywnych i nie wymieniających ciepła

z otoczeniem. Przekrój naczynia oraz prędkość przepływu cieczy powinny być zatem w danym miejscu przepływu stałe w czasie. W rzeczywistości, w naczyniach występują lokalne zmiany przekroju związane z tętnieniem, naczynia mają zdolność do kurczenia się, a prędkość przepływu zmienia się w rytmie akcji serca. Warunek braku wymiany ciepła z otoczeniem jest w przybliżeniu spełniony w stanach ustalonych, nie jest spełniony przy zmianach akcji serca, przy niestacjonarnej wymianie płynów w naczyniach włosowatych.

W cieczach rzeczywistych (np. krew) o lepkości η do utrzymania przepływu cieczy potrzebna jest różnica ciśnień $\Delta p = p_2 - p_1$, nawet w przewodach o stałym przekroju poprzecznym. Związane jest to z tym, że w układzie takim musi zostać wykonana praca, by zostały pokonane siły oporu związane z tarciem cieczy o ścianę przewodu oraz między warstwami cieczy, które poruszają się z różnymi prędkościami. Natężenie przepływu cieczy w przewodzie o długości l o promieniu przekroju r, opisywane jest wówczas wzorem Poiseuille'a

$$J = \frac{\Delta V}{\Delta t} = \frac{\pi}{8}\frac{1}{\eta}\frac{r^4}{l}\Delta p.$$

Natężenie przepływu jest proporcjonalne do różnicy ciśnień:

$$J = \frac{1}{R}\Delta p,$$

współczynnik R jest oporem naczyniowym przepływu:

$$R = \frac{8}{\pi}\eta\frac{l}{r^4}.$$

Wpływ ciśnienia dynamicznego na różnicę ciśnień między układem tętniczym i żylnym jest znikomy. Dla aorty składnik ten stanowi mniej niż 1% ciśnienia statycznego. Różnica ciśnień jest więc potrzebna tylko do pokonania oporów lepkościowych, a praca z tym związana zamienia się w ciepło.

Stosunek różnicy ciśnień między układem tętniczym a żylnym Δp i przepływu krwi J nazywany jest całkowitym obwodowym oporem naczyniowym:

$$R_{obw} = \frac{\Delta p}{J}\left[\frac{\text{mmHg}}{\text{ml/min}}\right].$$

Opór przepływu zależy od czynnika lepkościowego i geometrycznego. Nie są to czynniki stałe, w związku z tym znacząco wpływają na opór obwodowy i jego zmiany.

Krew jest cieczą niejednorodną ze względu na obecność w jej osoczu składników morfotycznych. Lepkość krwi zależy od hematokrytu, temperatury, przekroju naczynia (dla naczyń o średnicy mniejszej niż 0,3 mm), w którym płynie oraz od szybkości przepływu. Prędkość przepływu krwi w naczyniu nie jest jednakowa. Obserwuje się zjawisko akumulacji

osiowej. Przy ścianach krew płynie wolniej, w części środkowej szybciej. Obserwowana różnica prędkości w przekroju naczynia powoduje wprowadzenie krwinek w ruch obrotowy, co powoduje wprawienie w ruch cyrkulacyjny (wokoło krwinki) cieczy. Zgodnie z efektem Magnusa na taki układ poruszający się w ośrodku lepkim działa siła prostopadła do kierunku ruchu, która powoduje odchylenie cieczy. W ten sposób wytwarza się różnica ciśnień znosząca krwinkę w stronę osi przewodu. Lepkość krwi zależy również od prędkości przepływu. Przy fizjologicznych prędkościach krwi w naczyniach krew zachowuje się jak ciecz niutonowska, czyli posiada stałą wartość lepkości. Akumulacja osiowa powoduje jednak, że obserwowana lepkość jest mniejsza, gdyż krew płynąca między ścianami naczynia a prądem osiowym krwinek zmniejsza tarcie.

5.1.2 **Sprężyste właściwości naczyń krwionośnych**

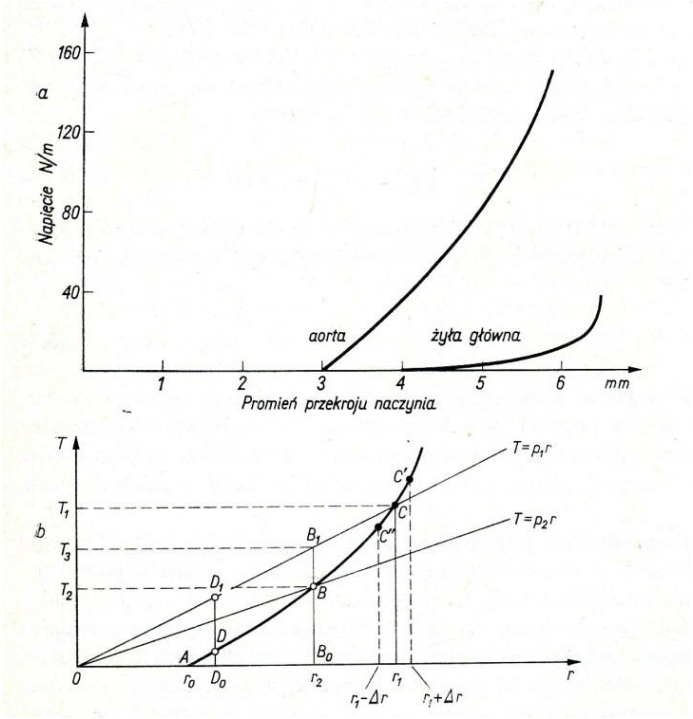
Natężenie przepływu cieczy niutonowskiej w naczyniu sztywnym jest zależne od różnicy ciśnień na jego końcach (zgodnie z prawem Poiseuille'a). Opór naczyniowy *R* jest więc stały. W naczyniach sprężystych obserwuje się zjawisko rozciągania się ścian naczyń spowodowane wzrostem różnicy ciśnień Δp, zmniejsza się wówczas czynnik geometryczny $\frac{l}{r^4}$ oraz opór naczyniowy. Ciśnienie, które działa na ściany jest równoważone ciśnieniem jakie wywiera ściana naczynia na przepływającą krew i spowodowane jest występowaniem napięć sprężystych *T* w ścianie:

$$T = \frac{F}{L}.$$

Siła *F* w tym równaniu jest wypadkową sił rozciągających ściany naczynia, na odcinku o długości *L*, które działają stycznie do powierzchni naczynia i są przyłożone prostopadle do odcinków równoległych do osi naczynia. Siłom tym przeciwstawiają się siły sprężyste w ścianie naczynia. Ciśnienie sprężyste *p*, z jakim ściana naczynia o promieniu przekroju *r* działa na ciecz, zależy od napięcia sprężystego:

$$p = \frac{T}{r}.$$

Zależność powyższa (prawo Laplace'a) dla przekroju aorty i żyły głównej przedstawiono na rysunku 5.2.

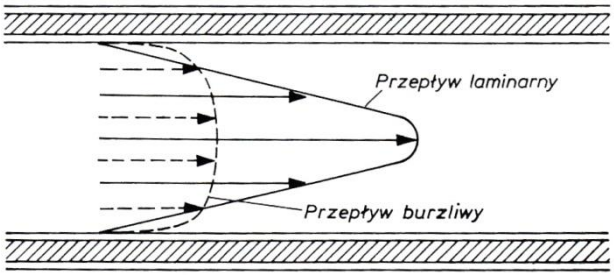


Rys. 5.2. Zależność napięcia sprężystego *T* aorty i żyły głównej od promienia przekroju *r* [3].

Napięcie sprężyste wzrasta w przybliżeniu liniowo wraz ze wzrostem promienia dla małych odkształceń naczynia, dla odkształceń większych obserwuje się szybszy wzrost tego parametru. Są to tzw. bierne napięcia naczyń, za które odpowiedzialna jest ich sprężystość. Takie zachowanie naczyń tłumaczone jest obecnością w nich elastyny oraz kolagenu, odpowiedzialnych za właściwości sprężyste ich ścian zbudowanych z tkanki łącznej. Za małe napięcia odpowiedzialne są bardziej elastyczne włókna elastyny, przy wzroście napięć odkształceniom ulegają bardziej odporne makrocząsteczki kolagenu.

Czynne napięcia naczyń są spowodowane ich zdolnością skurczową. Podczas skurczu zmienia się promień przekroju naczynia. Zmniejszanie się tego przekroju związane jest ze wzrostem oporu przepływu. Krew w naczyniu płynie do momentu, gdy ciśnienie między końcami naczynia i związane z nim ciśnienie działające na ściany naczynia, jest w stanie równoważyć ciśnienie czynne. Przy tzw. ciśnieniu krytycznym naczynie zamyka się.

Krew w naczyniach płynie ruchem laminarnym. Nadmierny wzrost prędkości krwi może powodować powstanie przepływów turbulentnych. Różnicę między tymi przepływami przedstawiono na rysunku 5.3.



Rys. 5.3. Rodzaje przepływów w naczyniach krwionośnych [2].

W układzie krążenia sytuacja taka ma miejsce podczas wyrzutu krwi z serca, przy otwarciu zastawek. Wówczas prędkość cieczy przekracza wartość krytyczną:

$$v_k = \frac{R_e \eta}{r\rho},$$

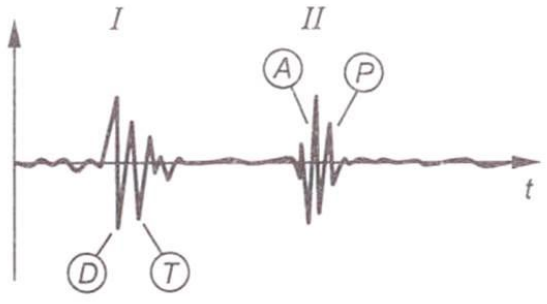
stała

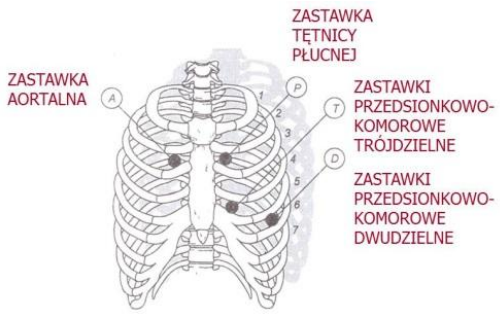
$$R_e = \frac{v_k r \rho}{\eta}$$

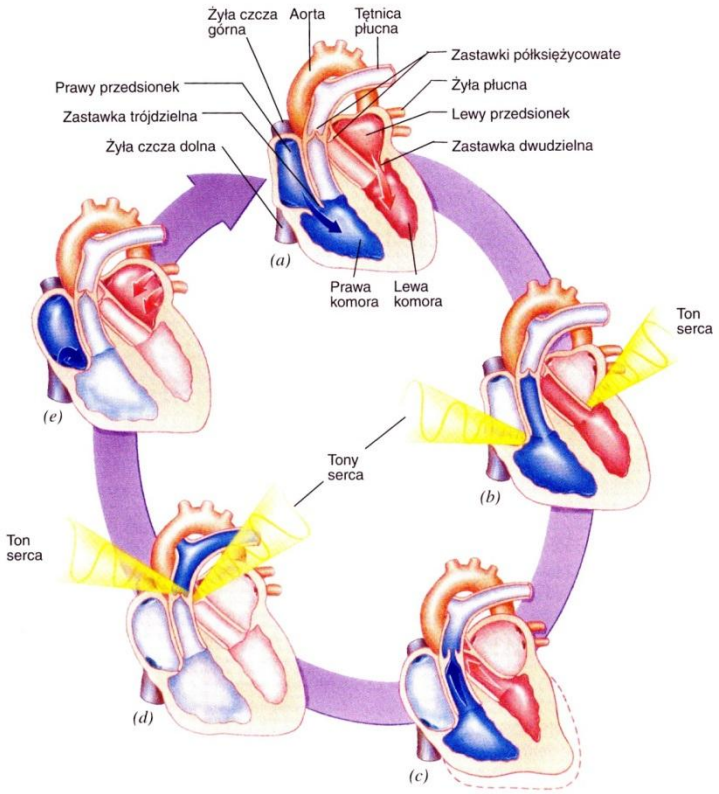
jest liczbą Reynoldsa, która dla krwi jest w przybliżeniu równa 1000.

Zmiana przepływu krwi w naczyniach ma ogromne znaczenie diagnostyczne. Pojawienie się przepływów turbulentnych powoduje powstanie drgań w układzie, które biorą udział w powstawaniu tonów serca (rys. 5.4.). Są to zjawiska akustyczne towarzyszące mechanicznej czynności serca. Wyróżnia się następujące rodzaje tonów serca:

- ton pierwszy (skurczowy) – 150 ms, 20-40 Hz;
- ton drugi (rozkurczowy) – 100 ms, 50 Hz;
- ton trzeci – obserwowany u młodych osobników;
- ton czwarty – rejestrowany tylko elektrofonograficznie.







Rys. 5.4. Fonokardiogram [4] i tony serca [11].

Ton pierwszy jest spowodowany zamknięciem zastawek przedsionkowo-komorowych, któremu towarzyszy drganie struktur zastawek, skurczem komór i drganiem ich ścian oraz wyrzutem krwi z komór. Powstaje wówczas fala uderzeniowa, która obejmuje ściany tętnicy płucnej i aorty. Ton drugi powstaje na skutek zamknięcia zastawek tętniczych (aorty i tętnicy płucnej) w fazie rozkurczu komór. Ton trzeci występuje we wczesnej fazie wypełniania się krwią komór i słyszalny jest nad koniuszkiem.

5.1.3 **Fala tętna**

Podczas rytmicznej pracy serca, co około 0,8 s, do obiegu dużego i małego wprowadzane są jednakowe objętości krwi – około 70 cm^3. Jest to tak zwana pojemność wyrzutowa serca w spoczynku. Opór obwodowy uniemożliwia natychmiastowe włączenie krwi w obieg krążenia. Skutkiem tego jest pojawienie się za sercem wybrzuszenia ścian tętnicy głównej. Odkształcenie takie rozchodzi w kierunku obwodowym w postaci fali tętna.

Podczas skurczu serca wyrzucana krew posiada energię kinetyczną E_k. Średnią energię kinetyczną $\bar{E}_k$ porcji krwi można opisać wzorem:

$$\bar{E}_k = \frac{m\bar{v}^2}{2},$$

gdzie $\bar{v}$ jest liniową prędkością średnią krwi o masie m. Masę krwi zdefiniować można jako $m = \rho \Delta x A$, gdzie ρ jest gęstością krwi, Δx drogą, którą przebywa fala tętna o prędkości v_t w czasie Δt, a A jest powierzchnią przekroju poprzecznego naczynia. Średnia prędkość liniowa krwi to stosunek strumienia objętościowego krwi Q do powierzchni pola poprzecznego A:

$$\bar{v} = \frac{Q}{A}.$$

Z wielkości zdefiniowanych powyżej można wyznaczyć maksymalną energię kinetyczną:

$$\bar{E}_k = \frac{\rho v_t \Delta t A Q^2}{2A^2}.$$

Energia ta jest zamieniana na energię potencjalną sprężystości E_p podczas tworzenia się odkształcenia ścian tętnicy głównej:

$$\bar{E}_p = \frac{(p_{sk} - p_{rozk})\Delta V}{2},$$

gdzie p_sk i p_rozk są ciśnieniami odpowiednio skurczowym i rozkurczowym, a ΔV jest objętością porcji krwi. Siły sprężyste ścian naczyń przywracają stan równowagi w miejscu powstania odkształcenia, przepychają krew w następne miejsce powodując w nim kolejne wybrzuszenie. Fala tętna jest falą ciśnieniową, która ulega osłabieniu w kierunku obwodowym. Korzystając z zasady zachowania energii można wyznaczyć impedancję tętniczą:

$$Z = \frac{\rho v_t}{A} = \frac{p_{sk} - p_{rozk}}{Q}.$$

Prędkość rozchodzenia się fali tętna wyznaczyć można z półempirycznego wzoru Moensa postaci:

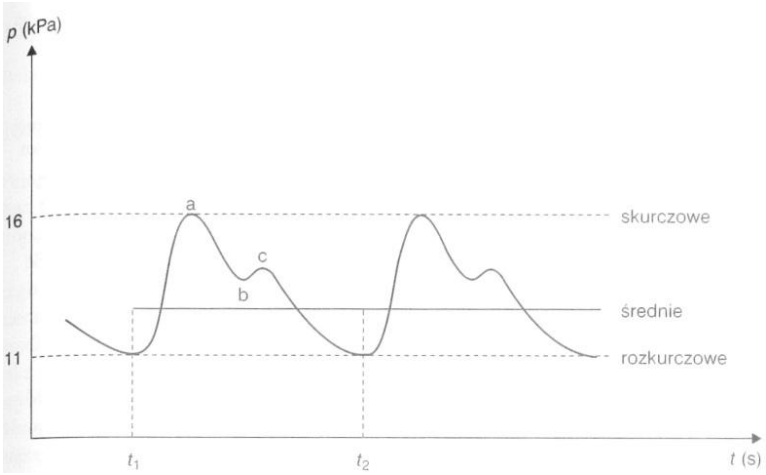
$$c = F\sqrt{\frac{Eh}{2\rho r}},$$

gdzie E jest modułem Younga ścian naczynia, h jest grubością ściany, ρ gęstością krwi, r promieniem przekroju naczynia. Parametr F to współczynnik empiryczny, charakterystyczny dla danego naczynia. Fala ta rozchodzi się z prędkością znacznie większą niż krew. Średnia prędkość fali tętna to około 5-8 m/s, a średnia prędkość krwi w tętnicy głównej to około 0,5 m/s. Długość fali tętna można wyznaczyć ze wzoru:

$$\lambda = cT,$$

T to okres cyklicznej pracy serca. Wynosi ona około 4 m.

Z powstawaniem fali tętna związana jest zmiana ciśnień w danym miejscu tętnicy (rys. 5.5.). Krzywa zmiany ciśnienia w funkcji czasu złożona jest z cyklicznie powtarzających się elementów, których czas trwania odpowiada czasowej ewolucji serca, czyli skurczowi i rozkurczowi. Ciśnienie podczas skurczu szybko rośnie proporcjonalnie do czasu (część narastająca krzywej), a następnie wolno maleje podczas rozkurczu (część opadająca krzywej, o charakterze zbliżonym do wykładniczego). W części rozkurczowej krzywej znajduje się załamek, zwany dykrotycznym. Jest on wynikiem chwilowego obniżenia ciśnienia krwi na skutek odbicia się krwi o zamykające się zastawki półksiężycowate.



Rys. 5.5. Przebieg fali tętna (zależność ciśnienia tętniczego od czasu) dla tętnicy głównej [1].

Zależność ciśnienia od czasu (t_r) w fazie rozkurczu można wyznaczyć z następującego wzoru:

$$p(t_r) = p_0 e^{-\frac{t}{\lambda}},$$

gdzie, p_0 jest maksymalnym ciśnieniem w czasie skurczu, λ czasem relaksacji ciśnienia ($\lambda = \eta/E$), czyli stosunkiem lepkości krwi do modułu sprężystości tętnicy.

Średnie ciśnienie krwi można obliczyć można natomiast obliczyć na podstawie przebiegu ciśnienia krwi w danym miejscu tętnicy:

$$\bar{p} = \frac{\int_{t_1}^{t_2} p\mathrm{d}t}{t_2 - t_1},$$

licznik tego równania jest polem powierzchni pod wykresem przebiegu ciśnienia krwi.

5.1.4 **Energetyka serca**

Energia potrzebna na wytworzenie w sercu ciśnienia i wypchnięcie krwi pochodzi z przemian biochemicznych w komórkach mięśniowych, głównie wykorzystujących glukozę. Serce potrzebuje tyle glukozy ile zużywa tlenu. Energia ta jest zużywana na:

- utrzymanie właściwego potencjału błony komórkowej (regulacja stężenie jonów sodu i potasu);
- aktywację mięśnia;
- czynność mechaniczną obejmującą pracę wykonaną przez elementy kurczliwe, wyrzucenie krwi i nadanie jej prędkości, odnowienie mięśnia.

Całkowita praca mechaniczna elementów kurczliwych serca wynosi:

$$W = E_m + W_z,$$

gdzie, E_m jest pracą wewnętrzną związaną z wytworzeniem naprężenia w sercu (energia mechaniczna wewnętrzna) oraz z przemianami metabolicznymi (energia metaboliczna), W_z jest natomiast pracą zewnętrzną związaną z wyrzutem krwi i jej przepływem. Praca zewnętrzna składa się z:

- energii potencjalnej ciśnienia W_p (zależy od ciśnienia komorowego p podczas wyrzutu krwi i objętości wyrzucanej krwi V, V_1 – objętość komory w późnej fazie rozkurczu, V_2 - objętość komory w późnej fazie skurczu):

$$W_p = \int_{V_1}^{V_2} p dV\,;$$

- energii kinetycznej prędkości W_k (zależy od gęstości krwi ρ, prędkości krwi v w miejscu ujścia z komory):

$$W_k = \int_{V_1}^{V_2} \frac{\rho v^2}{2} dV.$$

Całkowita praca wykonana przez komorę serca, której rezultatem jest wyrzut krwi wynosi:

$$W = \int_{V_1}^{V_2} (p + 0{,}5\rho v^2) dV + E_m.$$

Upraszczając to wyrażenie do postaci:

$$W = \bar{p}\Delta V + \frac{1}{2}\rho \bar{v}^2 \Delta V,$$

można obliczyć pracę serca dla prawej i lewej komory serca.

Przyjmując, że w spoczynku:

- średnie ciśnienie w lewej komorze $\bar{p}$ wynosi 100 mmHg;
- średnie ciśnienie w tętnicy płucnej $\bar{p}$ równe 15 mmHg
- średnia prędkość krwi w aorcie w czasie skurczu komory $\bar{v}$ wynosi 0,4 m/s;
- gęstość krwi ρ równa się 1060 kg/m^3;
- średnia pojemność wyrzutowa serca ΔV wynosi 70 ml,

można obliczyć pracę objętościową lewej komory, która wynosi:

$$\bar{p}_L \Delta V = 0{,}924 \frac{\mathrm{J}}{\mathrm{skurcz}},$$

pracę kinetyczną lewej komory:

$$\frac{1}{2}\rho \bar{v}_L^2 \Delta V = 0{,}006 \frac{\mathrm{J}}{\mathrm{skurcz}},$$

pracę objętościową prawej komory:

$$\bar{p}_R \Delta V = 0{,}139 \frac{\mathrm{J}}{\mathrm{skurcz}},$$

oraz pracę kinetyczną prawej komory:

$$\frac{1}{2}\rho \bar{v}_R^2 \Delta V = 0{,}006 \frac{\mathrm{J}}{\mathrm{skurcz}}.$$

Łączna praca objętościowa lewej i prawej komory serca w warunkach spoczynkowych wynosi 1,1 J/skurcz, natomiast praca kinetyczna obu komór to 0,012 J/skurcz (1% pracy objętościowej).

Moc serca można obliczyć z następującej zależności:

$$P = \frac{W}{t},$$

W jest pracą całkowitą wykonaną przez serce, a *t* jest czasem trwania skurczu i rozkurczu (0,8 s). Średnia spoczynkowa moc serca wynosi zatem 1,4 W. Średnie wartości mocy lewej i prawej komory można wyznaczyć z następujących zależności:

$$P_L = \bar{p}_L \mathrm{Q} + \frac{1}{2}\rho \bar{v}_L^2 \mathrm{Q}$$

$$P_R = \bar{p}_R \mathrm{Q} + \frac{1}{2}\rho \bar{v}_R^2 \mathrm{Q},$$

gdzie $Q = \Delta V / \Delta t$ jest średnim strumieniem objętości krwi (Δt – czas trwania całego cyklu serca). Dla pojemności minutowej serca wynoszącej 5,3 l/min, średni strumień objętości krwi wynosi 88 ml/s. Średnie moce objętościowe lewej i prawej komory wynoszą odpowiednio 1,16 W i 0,18 W. Ich moc kinetyczna jest jednakowa i wynosi około 0,008 W. Łączna spoczynkowa moc serca związana z uruchomieniem krążenia krwi w małym i dużym obiegu wynosi 1,4 W, czyli jest to około 2% mocy spoczynkowej człowieka.

Wydajność serca oblicza się z następującej zależności:

$$\eta = \frac{W}{E},$$

gdzie W jest pracą wykonaną przez mięsień sercowy do przepompowania całej krwi, a *E* jest pobraną na ten cel energią, którą wylicza się z ilości pobranego tlenu, wynosi ona 3-10%.

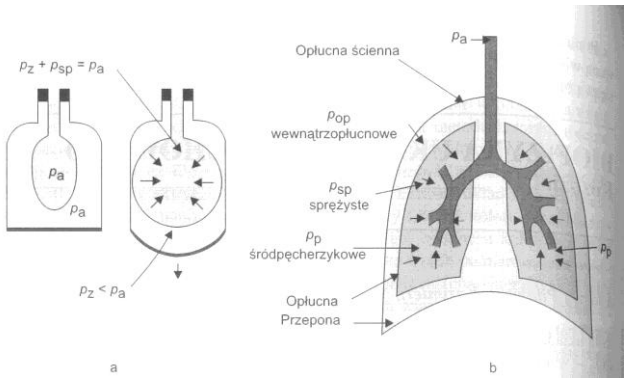
5.2 Biofizyka układu oddechowego

Za pomocą układu oddechowego odbywa się wymiana gazowa między środowiskiem zewnętrznym, a środowiskiem wewnętrznym organizmu. W procesie tym organizm jest zaopatrywany w tlen oraz jest z niego usuwany dwutlenek węgla. Drogi oddechowe uczestniczą w transporcie powietrza do płuc, w których odbywa się właściwa wymiana gazowa. Transport tlenu do komórek odbywa się za pomocą układu krążenia. Napełnianie płuc powietrzem i opróżnianie płuc z powietrza po wymianie gazowej nazywane jest wentylacją płuc.

5.2.1 **Proces wentylacji płuc**

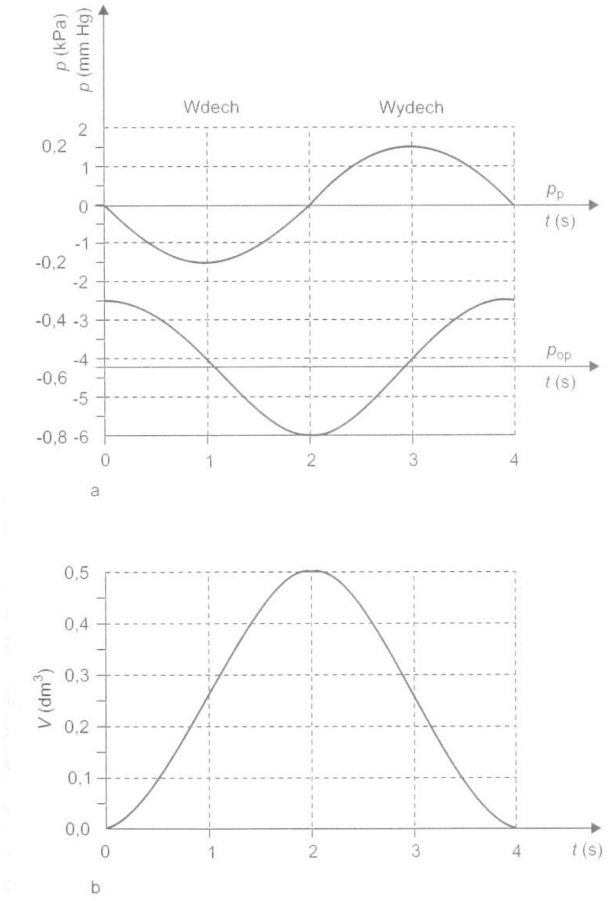
Czynność oddechowa organizmu jest procesem cykliczny odbywający się z częstotliwością 10-16 oddechów na minutę. Obejmuje ona dwie fazy: wdechu i wydechu oraz przerwę wydechową. Faza wdechu ma charakter czynny, do jej wykonania potrzebna jest praca mięśni klatki piersiowej i przepony, dzięki czemu powiększają objętości jam opłucnowych klatki piersiowej, a powstające w związku z tym podciśnienie powoduje rozciągnięcie płuc i pobranie powietrza. Wydech natomiast ma charakter bierny i czynny. Po skurczu mięśni oddechowych, zmniejsza się objętość klatki piersiowej i płuc dzięki biernym właściwościom sprężystym tkanek, z których są zbudowane następuje wydech. Czynność wydechowa czynna związana jest ze skurczową aktywnością mięśni brzucha. Głównym mięśniem warunkującym wentylację jest przepona.

Za proces wentylacji płuc odpowiada zmienna różnica ciśnień występująca między środowiskiem zewnętrznym, w którym panuje ciśnienie atmosferyczne, a ciśnieniem w płucach. Wyróżnia się dwa rodzaje ciśnień w płucach: wewnątrzopłucnowe (p_w) oraz śródpęcherzykowe (p_s). Ciśnienie wewnątrzopłucnowe panuje w przestrzeni opłucnowej, natomiast ciśnienie śródpęcherzykowe występuje w pęcherzykach płucnych (rys. 5.6.).



Rys. 5.6. Ciśnienie w pęcherzykach płucnych i tkance płucnej [1].

Pęcherzyki płucne posiadają właściwości sprężyste, ich ściany oplecione są włókienkami kolagenowymi. Różnica ciśnień między płucami, a przestrzenią opłucnową powoduje, że płuca wypełniają klatkę piersiową całkowicie. Za rozciągniecie płuc odpowiada różnica ciśnień $p_{sp} = p_s - p_w$, która działa przeciwko siłom sprężystym tkanki płucnej odpowiedzialnym za ich kurczenie się, czego konsekwencją jest zapadanie się płuc. Wynikiem działania sił sprężystych jest ciśnienie sprężyste (p_{sp}). Zmiany ciśnienia wewnątrzopłucnowego i śródpęcherzykowego podczas oddychania oraz objętości oddechowej przedstawia rysunek 5.7.



Rys. 5.7. (a) Zmiany ciśnienia wewnątrzopłucnowego i śródpęcherzykowego podczas oddychania, (b) zmiany objętości oddechowej [1].

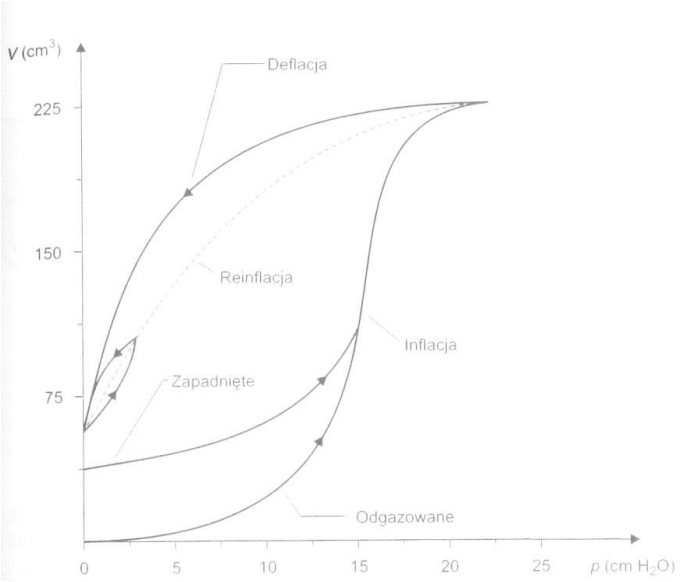
W stanie spoczynku ciśnienie śródpęcherzykowe jest równe ciśnieniu atmosferycznemu (p_a=p_s). Przy założeniu, że ciśnienie atmosferyczne jest ciśnieniem odniesienia i wynosi zero $p_a = p_s = 0$, ciśnienie wewnątrzopłucnowe jest ujemne (w stanie spoczynku wynosi ono około -4 mmHg). Płuca są wówczas rozciągnięte i wypełniają całą klatkę piersiową. Podczas wdechu, obserwuje się powiększenie klatki piersiowej, zmniejsza się wówczas ciśnienie wewnątrzopłucnowe do około -6 mmHg i następuje rozciągnięcie płuc. Wzrost objętości płuc pociąga za sobą wzrost objętości pęcherzyków płucnych. Zgodnie z prawem Boyle'a-

Mariotte'a ze wzrostem objętości gazu zmniejsza się jego ciśnienie, co oznacza, że w pęcherzykach płucnych spada ciśnienie do około 1,5 mmHg. Powstająca wówczas różnica ciśnień w drogach oddechowych powoduje ruch powietrza do pęcherzyków. Podczas wydechu mięśnie rozluźniają się, klatka piersiowa zmniejsza swoją objętość, a działanie sił sprężystych zmniejsza objętość pęcherzyków płucnych. Ciśnienie wewnątrzopłucnowe rośnie do wartości około -2,5 mmHg, a śródpęcherzykowe staje się dodatnie (1,5 mmHg). Powietrze w takich warunkach jest wypierane na zewnątrz.

Podczas wdechu zostaje do płuc wprowadzona tzw. objętość oddechowa powietrza V_T, która przy spokojnym oddechu wynosi 0,5 l. Objętość powietrza wdychana i wydychana w ciągu minuty nazywa się wentylacją minutową, która wynosi około 8 l/min.

5.2.2 **Właściwości mechaniczne tkanki płucnej**

Właściwości mechaniczne tkanki płucnej bada się podczas nadmuchiwania powietrzem i opróżniania płuc wyizolowanych. Bada się odpowiednie ciśnienia oraz objętości. Badania wykazały, że objętość płuc przy podwyższaniu ciśnienia zmienia się inaczej niż przy jego obniżaniu. Zjawisko to nazywane jest histerezą objętościowo-ciśnieniową (rys. 5.8.).



Rys. 5.8. Histereza objętościowo-ciśnieniowa podczas inflacji i deflacji izolowanego płuca kota [1].

Za powstawanie pętli histerezy odpowiedzialne są właściwości sprężyste tkanki płucnej oraz napięcie powierzchniowe warstwy powierzchniowej pęcherzyków płucnych. W pierwszej fazie inflacji, czyli napełniania się pęcherzyków płucnych powietrzem, płuca są mało podatne na odkształcenia. Musi zatem zadziałać pewne ciśnienie, zwane ciśnieniem otwarcia, by przezwyciężyć siły adhezyjne zapadniętych pęcherzyków. Następnie objętość

pęcherzyków rośnie wraz ze wzrostem ciśnienia, najpierw wolno, gdyż napełniają się pęcherzyki mniej oporne i większe, a potem gwałtownie, gdy napełniają się liczne małe pęcherzyki. Pęcherzyki płucne w płucach łączą się ze sobą. Dla takiego układu pęcherzyk większy powinien podczas procesu inflacji, czyli powiększać się jeszcze bardziej kosztem pęcherzyka mniejszego. Dzieje się tak, gdyż ciśnienie panujące w pęcherzyku mniejszym jest większe. Efektem końcowym takiego procesu byłoby napełnianie się powietrzem tylko pęcherzyków większych do objętości odpowiadającej maksymalnemu ciśnieniu w pęcherzyku, a następnie skokowy skok tej objętości do wartości takiej, przy której siły napięcia powierzchniowego zostają zastąpione przez siły sprężyste. Dzięki temu pęcherzyki nie pękają i ich wzrost zostaje zahamowany. Zapewnienie ciągłej zmiany objętości płuc wymaga działania dodatkowego procesu. Związany on jest ze zmianami napięcia powierzchniowego warstw powierzchniowych pęcherzyków. Ściany pęcherzyków płucnych są pokryte substancjami powierzchniowo-czynnymi – surfaktantami. Ich napięcie powierzchniowe zależy od grubości warstwy. Przy wdechu powiększa się powierzchnia pęcherzyków, zmniejsza się grubość warstwy surfaktantów i przez to zwiększa się napięcie powierzchniowe. Zgodnie z prawem Laplace'a:

$$\Delta p = \frac{4\sigma}{r},$$

zwiększone napięcie powierzchniowe σ powoduje wzrost ciśnienia, które wspólnie z ciśnieniem sprężystym tkanek umożliwia utrzymanie równowagi z ciśnieniem napierającego powietrza. Wzrost objętości odbywa się wówczas w sposób ciągły. Podczas wydechu, zmniejsza się objętość pęcherzyków, zwiększa grubość warstwy surfaktantów, napięcie powierzchniowe zmniejsza się i maleje ciśnienie. W związku z tym zmniejszanie ciśnienia jest sprzężone z ciśnieniem śródpęcherzykowym, co uniemożliwia zapadanie się pęcherzyków. Podczas procesu opróżniania pęcherzyków płucnych z powietrza (deflacja), w pierwszej fazie ciśnienie spada gwałtownie przy nieznacznym zmniejszeniu się objętości. Maleją gwałtownie siły naprężeń sprężystych włókienek białkowych budujących ścianę pęcherzyka, co powoduje równomierne i powolne opróżnianie pęcherzyków. W kolejnej fazie objętość maleje wraz ze zmniejszającym się ciśnieniem i opróżniane są liczne małe pęcherzyki. Napięcie powierzchniowe zapewnia im ciągłą zmianę objętości, dzięki czemu nie dochodzi się do ich zapadania.

5.2.3 **Praca i moc oddechowa**

Praca wykonana przez układ oddechowy związana jest z wprowadzeniem w ruch klatki piersiowej, przepony, narządów śródpiersia i jamy brzusznej, płuc oraz powietrza. Całkowitą pracę wykonaną przez mięśnie oddechowe można wyznaczyć znając energię zużytą na ten cel przez organizm. W sposób teoretyczny, pracę wykonaną na uruchomienie płuc oraz powietrza oblicza się na podstawie analizy różnicy ciśnień między pęcherzykami a opłucną. Podczas zwiększania objętości płuc o dV przy ciśnieniu p zostaje wykonana praca:

$$\mathrm{d}W = p\mathrm{d}V.$$

Praca wykonana przy zwiększeniu objętości o objętość oddechową V_T wyznacza się za pomocą następującego równania:

$$\mathrm{d}W = \int_0^{V_T} p\mathrm{d}V.$$

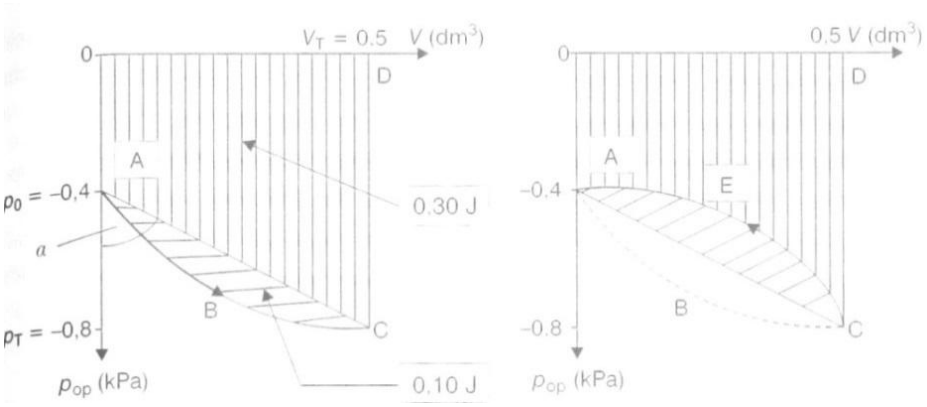
Wykonujące pracę ciśnienie $p = p_{sp} + p_{pow} + p_l + p_m$, składa się z ciśnień pokonujących następujące opory:

- sprężyste tkanki płucnej (p_{sp});
- ruchu powietrza w drogach oddechowych (p_{pow});
- lepkościowe tkanki płucnej (p_l);
- bezwładności mas wprowadzonych w ruch (p_m).

Ciśnienie p_m można pominąć ze względu na małą masę powietrza wprowadzonego do układu oraz małe przyspieszenie uruchamianych tkanek. Dzięki temu założeniu ciśnienie p składa się z ciśnienia pokonującego opory sprężyste (p_sp) oraz ciśnienia pokonującego opory niesprężyste (p_nsp). Pracę zatem można wyrazić za pomocą następującego wzoru:

$$W = \int_0^{V_T} p_{sp}\mathrm{d}V + \int_0^{V_T} p_{nsp}\mathrm{d}V.$$

W sposób praktyczny pracę oblicza się metodą planimetryczną. Polega ona na rejestracji zmieniającego się podczas oddychania ciśnienia wewnątrzopłucnowego oraz odpowiadające tym ciśnieniom zmianą objętości płuc (pomiar powietrza wdychanego i wydychanego za pomocą spirometru). Otrzymuje się wówczas dynamiczną pętlę histerezy (rys. 5.9.).



Rys. 5.9. Dynamiczna pętla histerezy obrazująca pracę oddechową [1].

Pole trapezu ACDO wyraża pracę przeciwko oporom sprężystym podczas wdechu – $\int_0^{V_T} p_{sp}\mathrm{d}V$. Pole ABCA odpowiada pracy przeciw oporom niesprężystym – $\int_0^{V_T} p_{nsp}\mathrm{d}V$. Całkę $\int_0^{V_T} p_{sp}\mathrm{d}V$ można obliczyć w następujący sposób: siły sprężyste podlegają prawu Hooke'a, przyrost ciśnienia jest proporcjonalny do przyrostu objętości:

$$\Delta p = \frac{1}{C}\Delta V,$$

gdzie współczynnik *C* jest podatnością płuc: $C = \frac{\Delta V}{\Delta p}$. Jest to zmiana objętości płuc wywołana jednostkową zmianą ciśnienia sprężystego. Graficznie, jest to tangens kąta nachylenia α prostej AC do osi *p*. Różnica ciśnień $\Delta p = p_{sp} - p_0$ wyraża przyrost ciśnienia sprężystego ponad ciśnienie wewnątrzopłucnowe. Przyrost objętości ΔV oznacza objętość powietrza wprowadzonego do płuc, wówczas:

$$p_{sp} = p_0 + \frac{1}{C}V.$$

Po wstawieniu tej zależności do wzoru na pracę wykonaną przeciw siłom sprężystym otrzymuje się następujące wyrażenie:

$$W_{sp} = \int_0^{V_T} p_{sp}\mathrm{d}V = \int_0^{V_T} \left(p_0 + \frac{1}{C}V\right)\mathrm{d}V = \frac{1}{2}(p_0 + p_T)V_T,$$

p_T jest ciśnieniem wewnątrzopłucnowym po wprowadzeniu do płuc powietrza o objętości oddechowej V_T. Praca ta stanowi około 60-70% pracy wdechu i jest zgromadzona jako energia potencjalna sprężystości w elementach sprężystych płuc. Kosztem pracy wykonanej na pokonanie oporów niesprężystych (około 30%, 25% – pokonanie oporów powietrza, 5% – oporów lepkościowych) wydziela się ciepło. Podczas wydechu cała praca wykonywana jest przy rozluźnionych mięśniach oddechowych, kosztem energii sprężystości zgromadzonej w elementach sprężystych płuc podczas wdechu. Pole ACEA wyraża pracę wykonaną na

pokonanie oporów niesprężystych, jej efektem jest ciepło. Pozostała część pola AECDO jest pracą sił retrakcyjnych, przywracającym płucom stan wyjściowy.

Praca wykonana przeciw oporom sprężystym płuc (wyznaczona z pola trapezu OACD) wynosi około 0,3 J na wdech. Pokonanie oporów niesprężystych wymaga po 0,1 J na wdech i wydech. Cała praca uruchamiająca płuca i powietrze wynosi więc około 0,5 J na jeden cykl oddechowy. Jeśli jeden cykl oddechowy trwa 4 s, przy wentylacji płuc 8 dm^3/min, to moc zużyta przez mięśnie oddechowe wynosi około 0,13 W. Całkowita praca, uwzględniająca ruchy oddechowe klatki piersiowej i inne może być obliczona na podstawie wydatku energetycznego przeznaczonego na ten cel, jest to tzw. koszt tlenowy. Mierzy się w tym celu nadwyżkę tlenu zużytego ponad poziom spoczynkowy przy oddychaniu wysiłkowym. Przy wentylacji 8 dm^3/min wynosi ono $4 \cdot 10^{-3}$ l O_2/min. Znając współczynnik energetyczny tlenu (20 kJ/dm^3) można wyliczyć energię zużytą na oddychanie, wynosi ona około 80 J/min, co odpowiada mocy 1,4 W (2% przemiany spoczynkowej). Podczas wysiłku moc ta może wzrosnąć nawet do 40 W. Wydajność energetyczna mięśni oddechowych to około 5-10%.

5.2.4 **Wymiana gazowa**

Wymiana gazów oddechowych między krwią a pęcherzykami płucnymi odbywa się na zasadzie dyfuzji. Na efektywność tego procesu wpływ ma rozpuszczalność gazów we krwi. Zjawisko to opisuje prawo Henry'ego: stężenie *c* gazu rozpuszczonego w cieczy jest w stanie równowagi proporcjonalne do ciśnienia cząstkowego p gazu powstałego nad cieczą, niezależnie od obecności innych gazów. Prawo to można zatem zapisać równaniem postaci:

$$c = \alpha p,$$

α jest współczynnikiem rozpuszczalności gazu, który zależy od rodzaju gazu i ciecz, od temperatury oraz ciśnienia całkowitego gazów nad cieczą. Stężenie c definiuje się jako stosunek objętości V_g jaką zajmuje gaz w warunkach normalnych, do objętości V cieczy:

$$c = \frac{V_g}{V}.$$

Za ilość gazu rozpuszczonego w cieczy przyjmuje się wartość ciśnienia cząstkowego tego gazu w warunkach normalnych, przy stałym ciśnieniu i stałej temperaturze.

Kierunki wymiany gazowej zależą od różnicy ciśnień cząstkowych gazów oddechowych w powietrzu atmosferycznym, płucach i krwi. Szybkość dyfuzji gazów z pęcherzyków do krwi opisuje się strumieniem objętości $\mathrm{d}V/\mathrm{d}t$ gazu dyfundującego przez

błony pęcherzyków i ściany naczyń do krwi. Jest on proporcjonalny do różnicy ciśnień cząstkowych gazu w pęcherzykach (p_A) i naczyniach włosowatych (p_C):

$$\frac{\mathrm{d}V}{\mathrm{d}t} = D_m(p_A - p_C),$$

gdzie D_m jest zdolnością dyfuzyjną płuc. Zdolność ta wyraża objętość gazu dyfundującą w danej jednostce czasu przy jednostkowej różnicy ciśnień cząstkowych gazu między pęcherzykami a krwią. Zdolność dyfuzyjna zależy od właściwości błon, powierzchni, rozpuszczalności gazu i wynosi dla tlenu około 20-43 cm^3/mmHg·min. W czasie wysiłku wzrasta do wartości 37-56 cm^3/mmHg·min, co najprawdopodobniej związane jest ze zwiększonym przepływem krwi. Dla dwutlenku węgla zdolność dyfuzyjna jest większa o 20-30 razy, co wiąże się z większą rozpuszczalnością w osoczu. Rozpuszczalność tlenu w osoczu jest bardzo mała. Bardzo ważną rolę w poprawie dyfuzyjności tlenu odgrywa hemoglobina, która wiąże tlen rozpuszczający się w osoczu. Tlen związany z hemoglobiną (oksyhemoglobina) jest następnie odprowadzany do krwi, dając tym samym możliwość rozpuszczania się kolejnym cząsteczkom tlenu. W ten sposób trzymuje się pewna różnica ciśnień powodująca dyfuzję tlenu do krwi. Dwutlenek węgla natomiast dyfunduje z krwi do pęcherzyków zgodnie z różnicą jego ciśnień cząstkowych. Podobnie jak tlen, dwutlenek węgla wiąże się z hemoglobiną tworząc związki karboamidowe oraz jest przenoszony w postaci wodorowęglanów, tak by zwiększyć efektywność jego rozpuszczania w osoczu.

Literatura

[1] red. F. Jaroszyk „*Biofizyka*", Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2011.
red. M. Bryszewska, W. Leyko „*Biofizyka dla biologów*", Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1997.

[2] W. Z. Traczyk „*Fizjologia człowieka w zarysie*", Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 1997.

[3] red. A. Pilawski „*Podstawy biofizyki"*, Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich, Warszawa 1977.

[4] G. Pawlicki „*Podstawy inżynierii medycznej*", Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej, Warszawa 1997.

[5] G. Ślósarek „*Biofizyka molekularna*", Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2011.

[8] I. P. Herman „*Physics of the Human Body*", Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2007.

[6] J. A. Tuszyński, M. Kurzyński „*Introduction to molecular biophysics*", CRC Press, Boca Raton, London, New Yoork, Washington, D.C. 2003.

[7] P. F. Dillon „*Biophysics A physiological Approach*", Cambridge University Press, New York, 2012.

[9] P. Davidovits „*Physics in Biology and Medicine*", Academic Press Burlington, USA, 2008.

[10] M. Hollins „*Medical Physics*", Thomas Nelson and Sons Ltd, UK 1992.

[11] E. P. Solomon, L. R. Berg, D. W. Martin, C. A. Villee „Biologia", MULTICO Oficyna Wydawnicza, Warszawa 1996.

Rozdział 6 Metody badawcze wykorzystywane do badań układów biologicznych

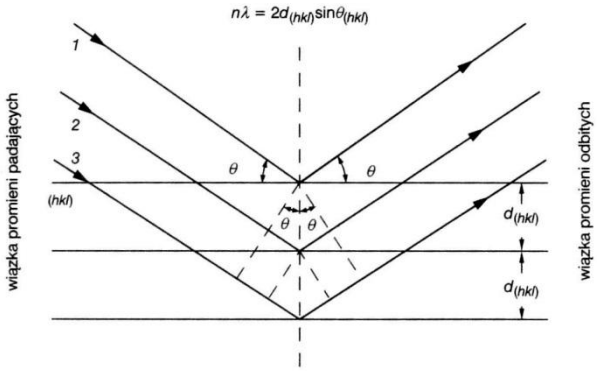
6.1 Rentgenografia

Rentgenografia to podstawowa metoda badania struktury materii uporządkowanej, w tym również analizy struktury biopolimerów. Wykorzystywane jest w niej promieniowanie rentgenowskie (promieniowanie X) o długości fali 0,2-2,5 $\cdot 10^{-10}$ m, co odpowiada energii 60-5 keV. Umożliwia ona uzyskanie obrazu kryształów w skali atomowej, czyli określenie położenia poszczególnych atomów, obliczenie odległości międzyatomowych i kątów między wiązaniami w badanych układach.

Za pomocą rentgenografii można badać kryształy makrocząsteczek biologicznych, które zalicza się do grupy kryształów molekularnych. Sieć przestrzenna takich kryształów utworzona jest z wyraźnie oddzielonych cząsteczek, ułożonych w sposób regularny. Obserwuje się tutaj uporządkowanie dalekiego zasięgu, co oznacza jednorodny rozkład makrocząsteczek w krysztale. Są to najczęściej kryształy związków organicznych, w których poszczególne cząsteczki łączą się poprzez wiązania wodorowe lub oddziaływania van der Waalsa. Krystalizacja makrocząsteczek jest procesem stopniowym, w którym czynnik strącający odpowiedzialny za zwiększenie oddziaływań pomiędzy cząsteczkami w roztworze, bardzo powoli przechodzi do roztworu macierzystego. Odbywa się ona w środowisku cieczy macierzystej, gdyż krystalizacja nie może naruszać naturalnego stanu makrocząsteczki. Kryształy białek nazywane są uporządkowanymi żelami z licznymi kanałami i zbiornikami wypełnionymi cieczą macierzystą. Zawierają one do 50% roztworu, którego cząsteczki mogą swobodnie dyfundować w całej objętości kryształu. Metodami krystalizacji białek są: mikrodializa oraz swobodna dyfuzja i zrównoważone odparowywanie.

6.1.1 Rozpraszanie promieniowania rentgenowskiego

Rentgenografia wykorzystuje zjawisko dyfrakcji padającego promieniowania rentgenowskiego na przestrzennie uporządkowanym układzie atomów. Padająca wiązka promieniowania rentgenowskiego jest rozpraszana przez zespoły płaszczyzn sieciowych (rys. 6.1.).



Rys. 6.1. Prawo Bragga – rozpraszanie promieniowania rentgenowskiego przez zespół płaszczyzn sieciowych [1].

Zjawisko to występuje, gdy spełnione są następujące warunki:

- atomy rozłożone są w krysztale periodycznie;
- długość fali promieniowania padającego jest porównywalna z odległościami między atomami w krysztale (rzędu nm), które stają się centrami rozpraszającymi;
- padające promieniowanie musi być spójne, źródłem takiego promieniowania są elektrony.

W wyniku rozpraszania promieniowania rentgenowskiego na elektronach poszczególnych atomów, elektrony te stają się samodzielnymi źródłami promieniowania o tej samej długości fali co promieniowanie padające. Promieniowanie takie rozchodzi się we wszystkich kierunkach i może ulegać interferencji. Fale te interferując ze sobą, dają pod określonymi kątami rozproszenia wzmocnienia. Wzajemnie nakładające się na siebie fale to promieniowanie, które zostało ugięte na poszczególnych płaszczyznach sieciowych. Zjawisko to opisuje prawo Bragga: interferencja promieniowania ugiętego na kolejnych płaszczyznach sieciowych występuje wtedy, gdy różnica dróg optycznych jest wielokrotnością długości fali (rys. 6.1.):

$$n\lambda = 2d\sin\theta,$$

gdzie λ jest długością fali promieniowania padającego, n oznacza rząd odbicia, d_{hkl} to odległość między płaszczyznami opisanymi współczynnikami Millera *hkl* w krysztale, θ to kąt pod jakim następuje odbicie promieniowania. Odbicie padającego promieniowania odbywa się tylko pod pewnymi kątami, ściśle określonymi przez rodzaj sieci krystalicznej. Intensywność fali rozproszonej jest proporcjonalna do liczby elektronów w atomie.

Fale, które docierają do detektora (np. klisza fotograficzna, kamera CCD) tworzą obraz dyfrakcyjny, składający się z refleksów (plamek interferencyjnych) o określonej

intensywności, które odpowiadają płaszczyznom sieciowym, równoległym do płaszczyzny o wskaźnikach (*hkl*).

Liczna elektronów w atomie oraz ich rozkład decydują o zdolności rozpraszania promieniowania rentgenowskiego przez atomy. Stosunek natężenia promieniowania rozproszonego przez pojedynczy atom do rozpraszania przez elektron nazywany jest atomowym czynnikiem rozpraszania lub amplitudą rozpraszania f_0. Wielkość tego czynnika jest proporcjonalna do liczby atomowej Z pierwiastka. Jest on również funkcją $\sin\theta/\lambda$ oraz zależy od temperatury T. Temperatura powoduje oscylacje atomów wokół położeń równowagi, co powoduje zmiany natężenia obserwowanych refleksów braggowskich. Po uwzględnieniu wszystkich tych czynników, atomowy czynnik rozpraszania można zapisać w postaci:

$$f(T) = f_0 \exp\left[-B(T)\left(\frac{sin\theta}{\lambda}\right)^2\right],$$

gdzie $B(T)$ jest stałą zależną od temperatury.

Sumę wszystkich fal odbitych od płaszczyzny sieciowej opisanej wskaźnikami (*hkl*) nazywa się czynnikiem struktury *F*(*hkl*):

$$F(hkl) = \sum_j f_j \exp\left[2\pi i\left(hx_j + ky_j + lz_j\right)\right],$$

gdzie f_j jest amplitudą rozpraszania promieniowania przez atom j w komórce elementarnej, h, k, l to wskaźniki Millera, a x_j, y_j, z_j są współrzędnymi określającymi położenie j-tego atomu w komórce. Czynnik struktury jest więc sumą amplitud fal ugiętych na atomach znajdujących się w komórce elementarnej, zależy więc od rozmieszczenia atomów w tej komórce.

Natężenie promieniowania *I*(*hkl*) określającego refleks o wskaźnikach (*hkl*) jest proporcjonalne do kwadratu czynnika struktury:

$$I_{hkl} = |F(hkl)|^2.$$

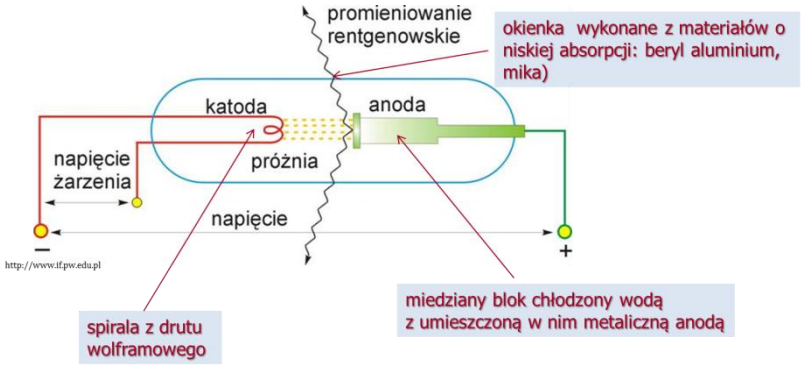
Natężenie to można wyznaczyć eksperymentalnie.

6.1.2 **Wytwarzanie promieniowania rentgenowskiego**

Promieniowanie rentgenowskie wykorzystywane w rentgenografii może być wytwarzane w lampie rentgenowskiej, akceleratorach liniowych i w synchrotronie.

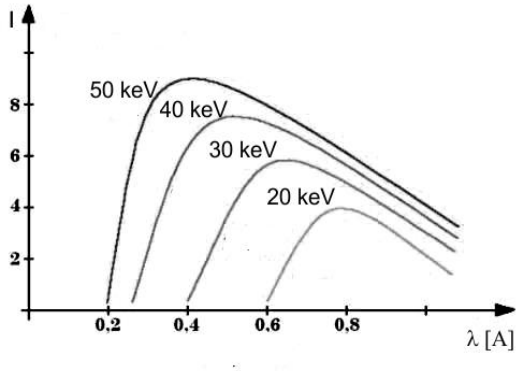
Lampa rentgenowska (rys. 6.2.) zbudowana jest z bańki próżniowej, w której znajdują się dwie elektrony: katoda w postaci spiralnie zwiniętego drutu wolframowego oraz anoda umieszczona w miedzianym bloku chłodzonym wodą. Katoda ogrzewana jest do temperatury

1500 – 2300 °C. W wyniku termoemisji emitowane są z niej elektrony, które następnie przyspieszane są w polu elektrycznym. Między anodą i katodą panuje różnica potencjałów z zakresu 10-100 kV. Przyspieszone elektrony zderzają się z atomami pierwiastka, z którego wykonana jest anoda. Zjawisko to nazywane jest hamowaniem elektronów na anodzie. W wyniku tego procesu powstaje promieniowanie rentgenowskie, które przez okienka wykonane z materiałów o niskiej absorpcji: beryl aluminium, mika, jest kierowane do układu eksperymentalnego.



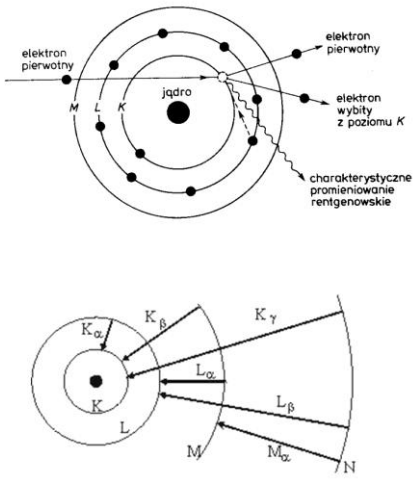
Rys. 6.2. Budowa lampy rentgenowskiej.

W wyniku zderzenia powstają dwa rodzaje promieniowania rentgenowskiego: o widmie ciągłym i charakterystycznym. Pierwsze promieniowanie, którego widmo ma charakter ciągły (widmo hamowania) powstaje, gdy hamowany na anodzie elektron traci energię ΔE emitując ją w postaci fotonu promieniowania $\Delta E = h\nu$. Elektrony mogą zderzać się z atomami anody w różny sposób (centralnie, peryferyjnie) tracąc różne ilości energii. W wyniku powstaje widmo ciągłe, które jest zbiorem fal o różnych długościach (rys. 6.3.). W skrajnych przypadkach elektron może utracić całą energię na wypromieniowanie jednego fotonu. Wyemitowana jest wówczas fala o maksymalnej częstości, czyli minimalnej długości fali. Widmo to charakteryzuje się zatem wyraźnie określoną granicą krótkofalową promieniowania rentgenowskiego (granica Duane'a-Hunta). Zakres długości fal oraz granica krótkofalowa zależą przede wszystkim od napięcia przyspieszającego między katodą a anodą.



Rys. 6.3. Widmo ciągłe promieniowania rentgenowskiego [4].

Widmo charakterystyczne promieniowania rentgenowskiego powstaje, gdy przy pewnych różnicach potencjałów (potencjał wzbudzenia) przyłożonych do lampy, przyspieszone elektrony mogą wybić elektrony z powłok atomów pierwiastka wchodzącego w skład anody (rys. 6.4.).

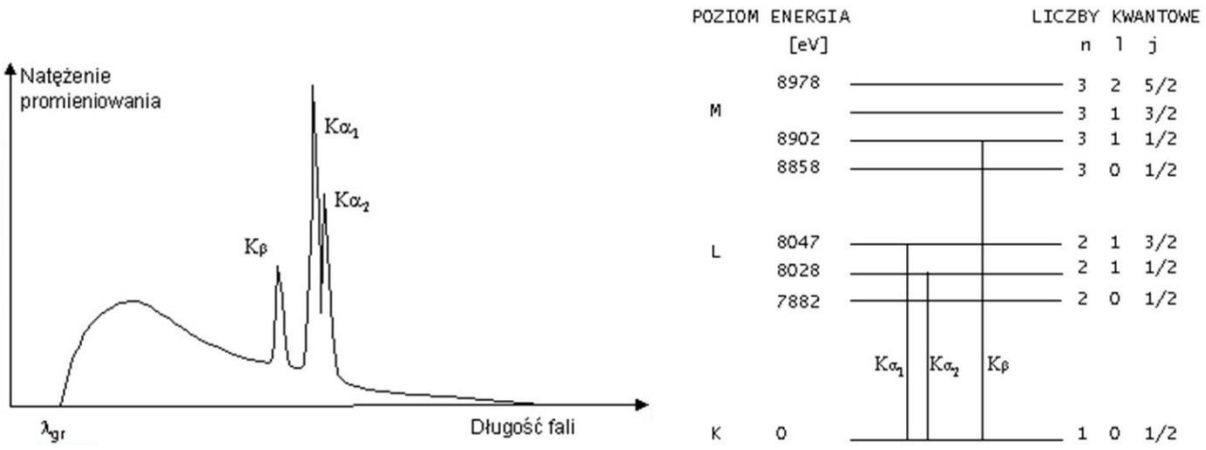


Rys. 6.4. Powstawanie promieniowania charakterystycznego [4].

Przeskok elektronu z poziomu energetycznie wyższego i zajęcie opróżnionego miejsca na poziomie niższym powoduje powstanie promieniowania charakterystycznego o energii równej różnicy energii między tymi poziomami. Powstają wówczas serie widmowe:

- K - usunięcie elektronu z poziomu K z następującym po nim przeskokiem elektronu z poziomu energetycznie wyższego L, M, N …
- L - usunięcie elektronu z poziomu L z następującym po nim przeskokiem elektronu z poziomu energetycznie wyższego M, N …

Widmo ciągłe (hamowania) oraz widmo charakterystyczne promieniowania rentgenowskiego zostało przedstawione na rysunku 6.5.



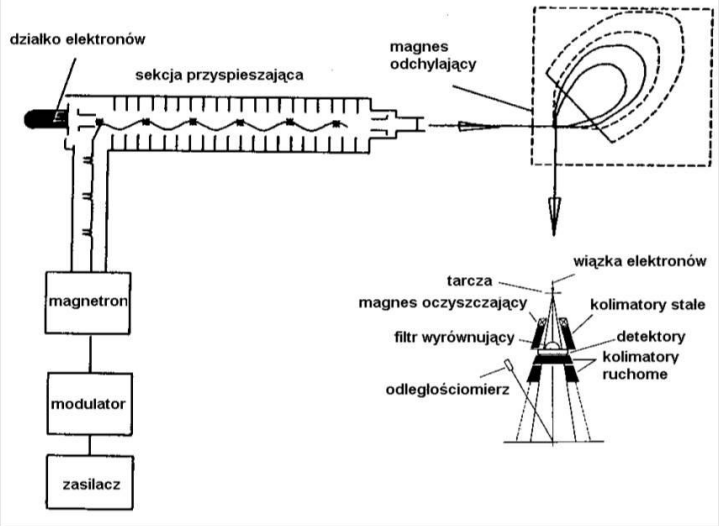
Rys. 6.5. Widmo ciągłe i charakterystyczne promieniowania rentgenowskiego [4].

Akcelerator liniowy jest urządzeniem do przyspieszania elektronów za pośrednictwem fali elektromagnetycznej do energii 6 – 25 MeV. Zbudowany jest on z następujących elementów:

- magnetronu, urządzenia generującego falę elektromagnetyczną o długości rzędu decymetrów (1 – 3 GHz);
- działa elektronowego, które jest wyrzutnią elektronów;
- magnesu odchylającego;
- głowicy, na której odbywa się hamowanie elektronów.

Schemat budowy oraz sposób wytwarzania promieniowania rentgenowskiego w akceleratorze przedstawiono na rysunku 6.6. Promieniowanie rentgenowskie jest w akceleratorze wytwarzane w następujących etapach:

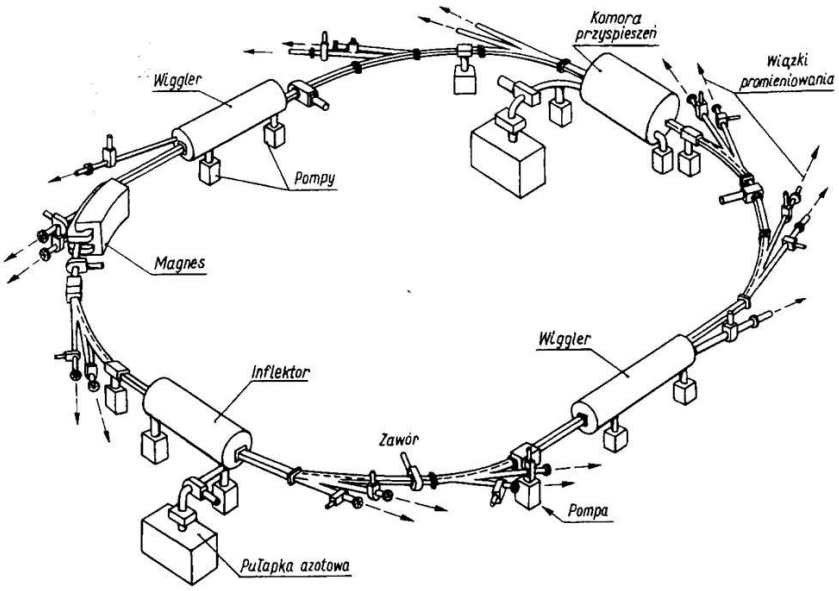
- generacja fali elektromagnetycznej o długości rzędu decymetrów (1 – 3 GHz) i mocy 30 – 40 MW;
- wrzucenie elektronu na „grzbiet" pola elektrycznego fali elektromagnetycznej;
- uzyskanie przez elektron energii (6 – 25 MeV) poprzez poruszanie się go wzdłuż wektora pola elektrycznego fali elektromagnetycznej;
- hamowanie elektronów o dużej energii na tarczy głowicy akceleratora liniowego.



Rys. 6.6. Schemat oraz zasada działania akceleratora liniowego [9].

Promieniowanie synchrotronowe jest promieniowaniem elektromagnetycznym, emitowanym podczas zmiany kierunku ruchu naładowanych cząstek (elektronów), poruszających się w polu magnetycznym z prędkościami relatywistycznymi po torze zamkniętym. Są one przyspieszane w polu elektrycznym, które jest cyklicznie włączane i wyłączane w stosunku do obiegu cząstek po wyznaczonym torze. Zakrzywienie toru jest realizowane za pomocą pola magnetycznego. Promieniowanie synchrotronowe o energiach rzędu GeV wytwarzane jest w synchrotronie. Urządzenie to zbudowane jest z następujących elementów (rys. 6.7.):

- akceleratora liniowego;
- urządzenia doładowującego;
- pierścienia synchrotronu, czyli obwodu o długości do kilkuset metrów, składającego się z kilku odcinków prostych na przemian z kilkoma odcinkami zakrzywionymi, które wyposażone są w następujące elementy:
    - inflektory - para równoległych do siebie elektrod, które odchylają wprowadzone cząstki tak, aby mogły pozostać na orbicie;
    - elektromagnesy - powodują zakrzywienie toru pędzących elektronów;
    - wigglery - obszary przemiennych pól magnetycznych;
    - komory przyspieszeń uzupełniające straty energii wynikłe z wypromieniowania fotonów.
- okienek wyprowadzających.



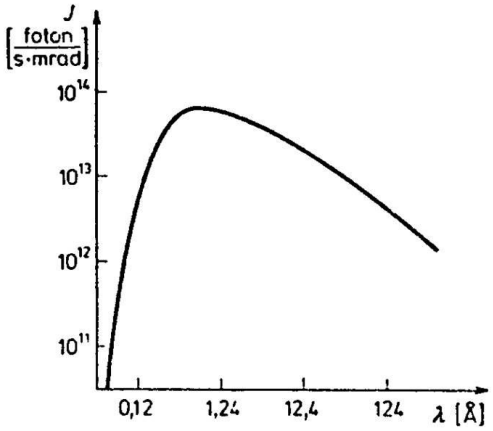
Rys. 6.7. Budowa synchrotronu [9].

Promieniowanie synchrotronowe wytwarzane jest w następujących etapach:

- wstępne przyspieszenie elektronów w akceleratorze do energii kilkudziesięciu MeV;
- wprowadzenie cząstek, odchylonych przez inflektor stycznie na orbitę synchrotronu;
- zwiększanie średniej energii cząstek poprzez zwiększanie częstości pola przyspieszającego i jednoczesne zwiększanie pola magnetycznego, warunkujące utrzymanie cząstek na tej samej orbicie;
- powstanie promieniowania synchrotronowego w wyniku zmian kierunku ruchu cząstek o dużych energiach;
- wyprowadzenie promieniowania przez okienka.

Widmo promieniowania synchrotronowego ma charakter ciągły (rys. 6.8.), można jednak z widma ciągłego wyciąć wiązkę monochromatyczną z dokładnością $\Delta\lambda/\lambda = 10^{-4}\text{-}10^{-6}$. Maksimum natężenia promieniowania (I_{max}) może znajdować się w części widzialnej, w nadfiolecie lub nawet w krótkofalowej części widma rentgenowskiego. Promieniowanie synchrotronowe jest silnie skolimowane (kąt rozbieżności wiązki wynosi 10^{-4} rad – 21 sekund kątowych i spolaryzowane (ulega polaryzacji liniowej, kołowej, lewo-

i prawoskrętnej.



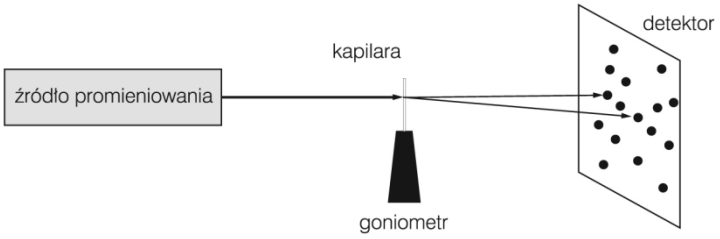
Rys. 6.8. Widmo promieniowania synchrotronowego [9].

Wiązka promieniowania synchrotronowego ma charakter impulsowy – czas jednego impulsu jest rzędu 0,1 ns, a odstęp między impulsami wynosi 1ns - 1μs. Promieniowanie to nie jest zanieczyszczone innymi rodzajami promieniowania, gdyż elektrony w synchrotronie biegną w próżni.

6.1.3 **Metody badań rentgenowskich**

W metodach badawczych wykorzystujących dyfrakcję promieni rentgenowskich stosuje się równanie Bragga na dwa sposoby. W metodzie klasycznej, przy ustalonej długości fali promieniowania zbierana jest informacja o rozkładzie kątowym rozpraszanego promieniowania. W metodzie czasu przelotu (dyspersji energii), wykorzystuje się wiązkę promieniowania o ciągłym rozkładzie długości fali, a rozpraszanie jest analizowane dla konkretnego kąta. W metodzie klasycznej, wykorzystującej promieniowanie monochromatyczne) wyróżnia się dwie metody badawcze: obracanego kryształu (dla monokryształów) i Debye'a-Scherrera-Hulla (dla polikryształów).

Uproszczony schemat układu do badania dyfrakcji promieni rentgenowskich został przedstawiony na rysunku 6.9. Promieniowanie rentgenowskie pochodzące na przykład z lampy rentgenowskiej pada na kryształ umieszczony w goniometrze. Następuje ugięcie promieniowania padającego na płaszczyznach kryształu, co jest rejestrowane na detektorze. Goniometr pełni w tym układzie badawczym funkcję urządzenia, które umożliwia obroty kryształu wokół kilku osi oraz ustawienie kryształu w wybranym kierunku.



Rys. 6.9. Schemat układu do badania dyfrakcji promieni rentgenowskich [3].

Metoda obracanego kryształu

W metodzie obracanego kryształu przedmiot badania stanowi monokryształ, który jest ustawiony w goniometrze prostopadle do padającej wiązki promieniowania i podczas eksperymentu jest obracany. Refleks uzyskuje się od poszczególnych płaszczyzn krystalograficznych monokryształu. Obraz dyfrakcyjny (dyfraktogram) stanowią refleksy rozmieszczone wzdłuż linii prostych zwanych warstwicami, którym odpowiadają wartości h wskaźników Millera (rys. 6.10.).

Interpretacja otrzymywanych obrazów dyfrakcyjnych jest przeprowadzana na podstawie znajomości równań Lauego postaci:

$$a_0(\cos\alpha - \cos\alpha_0) = h\lambda$$
$$b_0(\cos\beta - \cos\beta_0) = k\lambda$$
$$c_0(\cos\gamma - \cos\gamma_0) = l\lambda,$$

gdzie parametry a_0, b_0, c_0 to stałe sieciowe wzdłuż osi krystalograficznych a, b, c, kąty α_0, β_0, γ_0 oraz α, β, γ to odpowiednio kąty między padającą a ugiętą wiązką promieni a osiami krystalograficznymi a, b, c kryształu. Przy orientacji kryształu wartości kątów α_0, β_0, γ_0 są ściśle określone, wówczas równania Lauego określają położenia refleksów braggowskich.

Jeśli promień padający jest prostopadły do osi a, wtedy α_0=90º, równanie Lauego wówczas ma postać:

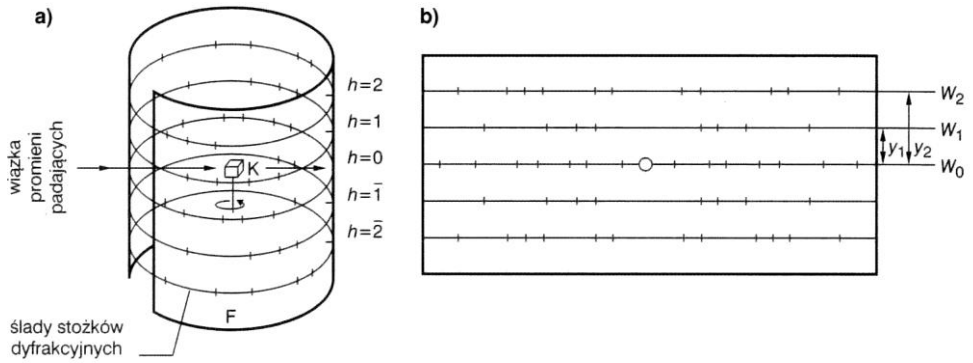
$$a_0 cos\alpha = h\lambda.$$

Z odległości y_h między warstwicą zerową a h-tą można obliczyć kąt α, znając promień kamery R, w której umieszczono kryształ ($\mathrm{ctg}\alpha_h = y_h/R$). Eksperyment ten odbywa się przy znanej długości promieniowania rentgenowskiego, zatem z równania:

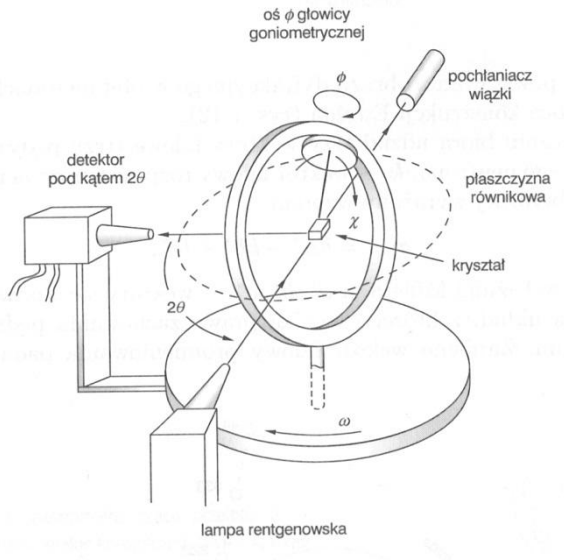
$$a_0 = \frac{h\lambda}{\cos\alpha_h},$$

można obliczyć stałą sieciową a_o. Podobną analizę można przeprowadzić dla pozostałych stałych sieciowych, zmieniając orientację kryształu.

W nowoczesnych metodach goniometrycznych, informacja o położeniach refleksów oraz ich natężeniu jest zbierana automatycznie za pomocą odpowiednich programów komputerowych. Monokryształ jest mocowany w głowicy goniometrycznej i można go obracać niezależnie wokół czterech osi, trzy z nich (ω, ϕ, χ) umożliwiają ustawienie kryształu w dowolnej płaszczyźnie odbijającej promieniowanie, a czwarta (2θ) rejestruje rozpraszanie promieniowania (rys. 6.11.).



Rys. 6.10. Schemat metody obracanego kryształu (a) oraz otrzymany obraz warstwicowy (b) [1].



Rys. 6.11. Schemat dyfraktometru czterokołowego [1].

Metoda Debay'a–Scherera–Hulla (DSH)

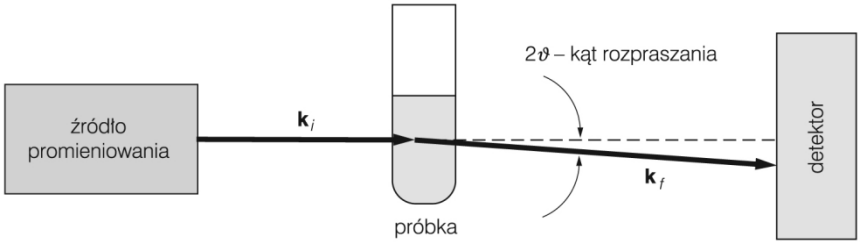
Metoda Debay'a–Scherera–Hulla jest podstawową metodą badania substancji polikrystalicznych. Stosuje się w niej monochromatyczne promieniowanie X. Przedmiot badania stanowi próbka złożona z rozmieszczonych statystycznie krystalitów o wielkości 0,1-10 μm. Refleks uzyskuje się od tych płaszczyzn krystalograficznych poszczególnych krystalitów, które są umieszczone pod kątem spełniającym równanie Bragga. Refleksy tworzą kąt 2Θ z wiązką pierwotną promieni i układają się na tworzącej stożka. Obraz otrzymywany w tej metodzie to debajogram, który tworzą współosiowe okręgi lub ich części.

Metoda czasu przelotu

W metodzie czasu przelotu analizuje się zależność natężenia promieniowania w funkcji odległości międzyatomowych. Widmo ciągłe rozproszonego promieniowania rejestrowane jest w tej metodzie przez detektor umieszczony pod określonym kątem. Dzięki różnym długościom fali w promieniowaniu padającym warunek Bragga jest jednocześnie spełniony dla różnych płaszczyzn krystalograficznych.

6.1.4 Rozpraszanie małokątowe (SAXS - Small Angle X-Ray Scattering)

Rozpraszanie małokątowe promieniowania rentgenowskiego jest obserwowane w zakresie od kilku minut do kilku stopni (0,1º-10º). Efekt rozpraszania pojawia się na skutek niejednorodności w rozkładzie materii. Małokątowe rozpraszanie promieni X związane jest z występowaniem fluktuacji gęstości elektronowej. Schemat eksperymentu umożliwiającego analizę rozpraszania promieni rentgenowskich pod małym kątem przedstawia rysunek 6.12.



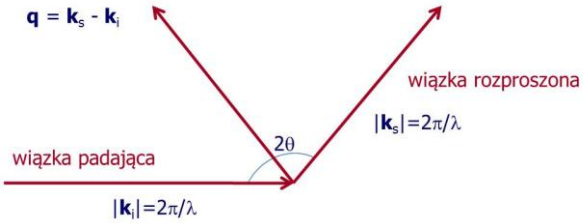
Rys. 6.12. Schemat eksperymentu SAXS [3].

Najważniejszym parametrem obserwowanym w eksperymencie jest wektor rozpraszania **q** (rys. 6.13.), który jest różnicą wektorów falowych charakteryzujących wiązkę padającą ($\mathbf{k}_i$) i rozproszoną ($\mathbf{k}_s$):

$$\mathbf{q} = \mathbf{k}_s - \mathbf{k}_i.$$

Wartość tego wektora (jego długość) wynosi:

$$q = \frac{4\pi \sin\theta}{\lambda}.$$



Rys. 6.13. Wektor rozpraszania – definicja.

W eksperymencie wyznacza się natężenie promieniowania rozproszonego. Definiuje się je jako iloczyn $I(q)$ natężenia rozpraszania pojedynczej cząsteczki (czynnik kształtu) i $S(q)$ oddziaływania między cząsteczkami (czynnik struktury):

$$I_z(q) = I(q)S(q).$$

Jest ono proporcjonalne do liczby fotonów promieniowania rentgenowskiego rozproszonych w kierunku wyznaczonym przez wektor rozpraszania. Dane eksperymentalne dostarczają informację na temat kształtu badanych cząsteczek. Zjawisko rozpraszania promieniowania rentgenowskiego dla małych wartości kąta rozpraszania opisuje równanie Guiniera:

$$I(q) = I(0)\exp\left(-\frac{4\pi^2}{3}q^2R_g^2\right),$$

w którym $I(0)$ jest intensywnością promieniowania dla q=0, a R_g to promień żyracji. Z zależności log$I(q)$ od kwadratu wektora rozpraszania q^2 można wyznaczyć promień żyracji badanej cząsteczki. Jest on miarą odstępstwa kształtu badanej makrocząsteczki od formy kulistej. Ekstrapolując funkcję $I(q)$ wyznaczyć można wielkość natężenia rozpraszania przy zerowym kącie rozpraszania $I(0)$. Zmiana wielkości $I(0)$ w funkcji stężenia makrocząsteczek umożliwia obliczenie ich masy cząsteczkowej wraz z masą otoczki hydratacyjnej.

Metoda SAXS wymaga stosowania promieniowania monochromatycznego o ściśle określonej długości fali. W tym celu stosowane są lampy rentgenowskie z wirującą katodą lub promieniowanie synchrotronowe, które ze względu na większą energię poprawia jakość uzyskiwanych wyników eksperymentalnych. Układ kolimacyjny powinien być tak skonstruowany, by niwelować rozpraszanie na szczelinach, system pomiarowy powinien znajdować się w próżni.

6.2 Spektroskopia Ramana i spektroskopia w podczerwieni

Spektroskopie Ramana i w podczerwieni dotyczą analizy stanów oscylacyjnych cząsteczek. W metodach tych bada się odpowiednio światło rozproszone lub przechodzące przez układ badawczy. W spektroskopii Ramana wykorzystuje się w tym celu światło z zakresu widzialnego, natomiast w spektroskopii w podczerwieni promieniowanie podczerwone o zakresie spektralnym między mikrofalami i promieniowaniem widzialnym, które dzieli się na trzy zakresy:

- bliskiej podczerwieni NIR (13335-5000 cm^{-1});
- średniej podczerwieni MIR (5000-400 cm^{-1});
- dalekiej podczerwieni FIR (400-10cm^{-1}).

Widma oscylacyjne są rejestrowane w zakresie bliskiej i średniej podczerwieni. Są one efektem przejścia elektronu między poziomami oscylacyjnymi w ramach jednego poziomu elektronowego. W dalekiej podczerwieni obserwowane są widma rotacyjne, które związane są z przejściem elektronu między stanami rotacyjnymi w obrębie jednego stanu oscylacyjnego.

Techniki te umożliwiają określenie struktury drugorzędowej makrocząsteczek biologicznych oraz badanie dynamiki badanych układów.

6.2.1 **Teoria drgań oscylacyjnych**

Całkowita energia cząsteczki jest sumą energii elektronowej E_{el}, oscylacyjnej E_{osc} i rotacyjnej E_{rot}, związanych odpowiednio z jej ruchem translacyjnym, oscylacyjnym zrębów atomowych wokół położenia równowagi i rotacyjnym całej cząsteczki:

$$E = E_{el} + E_{osc} + E_{rot}.$$

Cząsteczka może zatem występować w trzech stanach energetycznych o energiach spełniających relację:

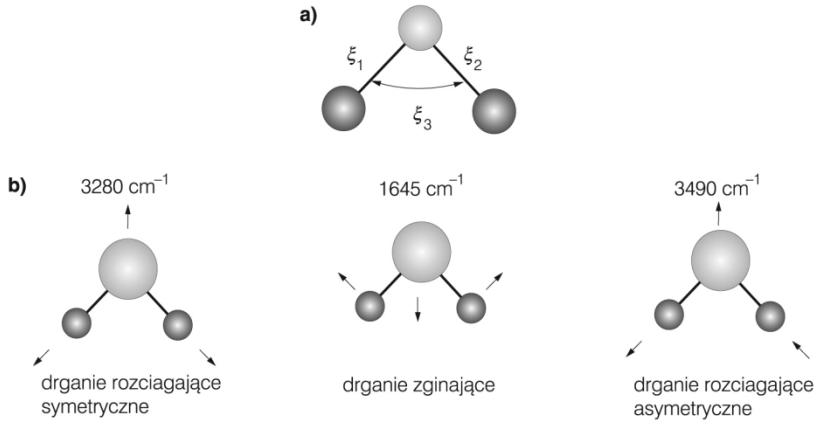
$$E_{el} \gg E_{osc} \gg E_{rot}.$$

Każdy poziom elektronowy jest zatem rozdzielony na poziomy oscylacyjne, a poziomy oscylacyjne na poziomy rotacyjne. Zmiany w cząsteczce związane z przejściem elektronu pomiędzy poziomami oscylacyjnymi jednego poziomu elektronowego ujawniają się w widmie rejestrowanym w zakresie promieniowania w bliskiej i średniej podczerwieni. W dalekiej podczerwieni są natomiast obserwowane zmiany związane z przejściami elektronu między stanami rotacyjnymi w obrębie jednego stanu oscylacyjnego.

Molekuły występujące w przyrodzie składają się z wielu atomów połączonych wiązaniami chemicznymi. Podczas ruchów oscylacyjnych obserwuje się zmiany długości wiązań oraz kątów między nimi. Liczba stopni swobody przypadająca na oscylacje cząsteczki zależy od liczby atomów ją tworzących. W przypadku molekuł nieliniowych, na oscylacje przypada 3*N*-6 drgań o różnych częstościach, gdyż całkowita liczba stopni swobody molekuły (3*N*) pomniejszona jest o 3 stopnie swobody przypadające na ruchy rotacyjne całej molekuły i 3 stopnie swobody przypadające na jej ruchy translacyjne. Dla molekuł liniowych liczba oscylacyjnych stopni swobody wynosi 3*N*-5.

W spektroskopii oscylacyjnej pod uwagę brane są tylko drgania własne cząsteczki, czyli takie, które nie powodują jej rotacji i translacji.

Drgania oscylacyjne opisuje się w tzw. układzie współrzędnych wewnętrznych cząsteczki. Liczba współrzędnych wewnętrznych odpowiada liczbie stopni swobody cząsteczki. Jeśli cząsteczka np. wody zbudowana jest z trzech atomów połączonych dwoma wiązaniami chemicznymi, to posiada ona trzy współrzędne wewnętrzne: dwie, opisujące rozciąganie wiązań OH (ξ_1 i ξ_2) oraz współrzędną (ξ_3) opisującą zmianę kąta między tymi wiązaniami (rys. 6.14.)



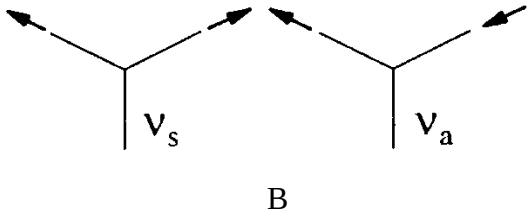
Rys. 6.14. a) Współrzędne wewnętrzne; b) Drgania normalne cząsteczki wody [3].

Drgania własne cząsteczki można w (3*N*-6)-wymiarowej przestrzeni współrzędnych wewnętrznych rozłożyć na wzajemnie niezależne i ortogonalne drgania składowe nazywane drganiami normalnymi. Drganie takie jest definiowane jako jednoczesny ruch atomów lub grup funkcyjnych cząsteczki (oscylacje) wokół położenia równowagi, odbywający się w zgodnej fazie i z jednakową częstością. Drgania normalne są wzajemnie niezależne. W drganiu tym amplitudy wychyleń atomów z położenia równowagi mogą być różne, podczas tego drgania nie występuje przemieszczenie środka masy cząsteczki.

Oscylacje można zatem opisać za pomocą współrzędnych normalnych q_i, określających przemieszczenie zrębów atomowych względem położenia równowagi. Ruch wszystkich zrębów atomowych w i-tym drganiu normalnym opisuje jedna współrzędna normalna q_i. Oscylacje atomów cząsteczki są związane z jej strukturą, czyli rodzajem drgających atomów, siłą oddziaływań między nim i sposobem ich ułożenia w cząsteczce.

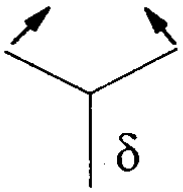
Drgania normalne klasyfikuje się ze względu na rodzaj symetrii cząsteczki. Poszczególne elementy symetrii (płaszczyzna symetrii, środek inwersji, oś obrotowo inwersyjna) określają wszystkie ruchy oscylacyjne cząsteczki. Kryteria podziału drgań normalnych są następujące:

– zmiany w wiązaniach lub kątach walencyjnych:
  - drgania rozciągające symetryczne i asymetryczne (ang. *stretching*), w których obserwuje się zmianę długości wiązań;



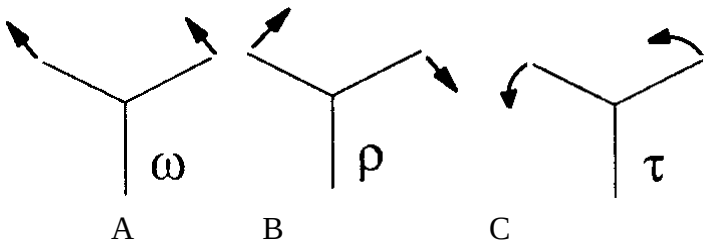
Rys. 6.15. Drgania rozciągające: A - symetryczne, B – antysymetryczne [11].

  - drgania zginające (ang. *bending*), w których występuje zmiana kątów walencyjnych;



Rys. 6.16. Drganie zginające [11].

  - drgania wahadłowe (ang. *wagging*), podczas których następuje ruch atomów w fazie poza płaszczyznę, z pozostawieniem w płaszczyźnie innych atomów w molekule;
  - drgania kołyszące (ang. *rocking*) - atomy wychylają się w płaszczyźnie w zgodnej fazie;
  - drgania skręcające (ang. *twisting*) - podczas ruchu następuje skręcenie płaszczyzny molekuły;



Rys. 6.17. Drgania: A – wahadłowe, B – kołyszące, C – skręcające [11].

- płaszczyzny drgania:
  - drgania w płaszczyźnie (ang. *in plane*);
  - drgania poza płaszczyznę (ang. *out of plane*);
- symetrii wychyleń drgań:
  - drgania symetryczne (ang. *symmetric*);
  - antysymetryczne (ang. *antisymmetric*);
  - drgania zdegenerowane dwukrotnie, trójkrotne, itp., zależnie od liczby jednakowych oscylatorów w molekule.

Oscylacje cząsteczek można opisać za pomocą praw mechaniki klasycznej stosując model oscylatora harmonicznego dla układu dwuatomowego. W takim przypadku jądra atomów cząsteczki traktuje się jako dwie kule o masach m_1 i m_2 połączone sprężyną, która odzwierciedla wiązanie chemiczne między atomami. W stanie równowagi długość sprężyny wynosi r_0. Kule mogą wykonywać ruch translacyjny po prostej, na której leżą. Kiedy oddalają się od siebie na odległość $r > r_0$ sprężyna rozciąga się. Pojawia się wówczas siła sprężystości, która przeciwdziała rozciąganiu i kieruje kule do położenia równowagi. Siła sprężystości jest proporcjonalna do wychylenia:

$$F = -fq,$$

gdzie wychylenie jest definiowane jako $q = r - r_0$, a f jest stałą siłową.

Oscylator harmoniczny spełnia zatem prawo Hooke'a. Równanie ruchu dla tego modelu ma postać:

$$m_r \frac{\mathrm{d}^2\mathrm{q}}{\mathrm{d}t^2} + fq = 0,$$

m_r jest masą zredukowaną

$$m_r = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2}.$$

Dla oscylatora harmonicznego wychylenie q zmienia się periodycznie:

$$q = Q\cos 2\pi\nu t,$$

gdzie ν jest częstotliwością drgań własnych oscylatora, a Q amplitudą wychyleń atomów z położenia równowagi. Dostarczenie energii do układu powoduje wzrost amplitudy drgań rozciągających oscylatora. Częstotliwość tych drgań wyznacza się z równania Lagrange'a:

$$\frac{\mathrm{d}}{\mathrm{d}t}\left(\frac{\mathrm{d}T}{\mathrm{d}\dot{q}}\right)+\frac{\mathrm{d}U}{\mathrm{d}q}=0,$$

w którym wielkości T i U oznaczają energię kinetyczną i potencjalną układu drgającego. Podczas oscylacji następuje ciągła zmiana energii kinetycznej związanej z ruchem atomów oraz energii potencjalnej związanej ze zmianą długości wiązań. Energię potencjalną oscylatora można wyznaczyć z prawa Hooke'a:

$$\mathrm{d}U=(-F)\mathrm{d}q$$

$$\frac{\mathrm{d}U}{\mathrm{d}q}=fq$$

$$U=\frac{1}{2}fq^2.$$

Wiedząc, że prędkość ruchu oscylatora wynosi $\frac{\mathrm{d}q}{\mathrm{d}t}$, energię kinetyczną można przedstawić za pomocą następującego wyrażenia:

$$T=\frac{1}{2}m_r\left(\frac{\mathrm{d}q}{\mathrm{d}t}\right)^2.$$

Wstawiając do równania Lagrange'a wyrażenia na energię potencjalną i kinetyczną otrzymuje się równanie ruchu oscylatora harmonicznego:

$$m_r\frac{\mathrm{d}^2q}{\mathrm{d}t^2}+fq=0.$$

Rozwiązaniem tego równania jest funkcja harmoniczna: $q=Q\cos 2\pi\nu t$, a częstość własna drgań oscylatora harmonicznego wynosi:

$$\nu=\frac{1}{2\pi}\sqrt{\frac{f}{m_r}}\,[\mathrm{Hz}].$$

Częstość tą w spektroskopii oscylacyjnej wyraża się jako liczbę falową, której jednostką jest cm^{-1}:

$$\nu=\frac{1}{2\pi c}\sqrt{\frac{f}{m_r}}\,[\mathrm{cm}^{-1}].$$

Drgania atomów w molekułach mają charakter skwantowany. Rozwiązując równanie Schrödingera dla oscylatora dwuatomowego:

$$-\frac{h^2}{8\pi^2m_r}\frac{\mathrm{d}^2\psi}{\mathrm{d}t^2}+\frac{1}{2}fq^2\psi=E\psi,$$

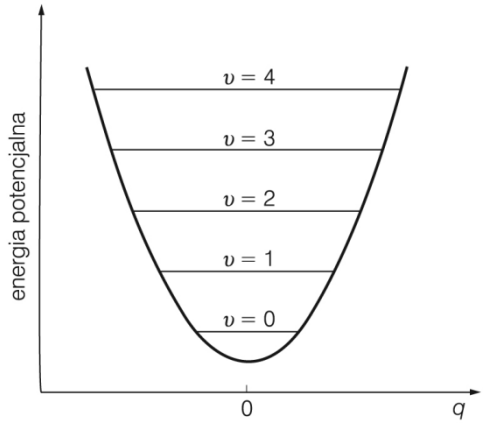
otrzymuje się energie stanów oscylacyjnych tego oscylatora postaci:

$$E_{osc} = h\nu\left(\upsilon + \frac{1}{2}\right) = \frac{h}{2\pi}\sqrt{\frac{f}{m_r}}\left(\upsilon + \frac{1}{2}\right) = \hbar\sqrt{\frac{f}{m_r}}\left(\upsilon + \frac{1}{2}\right)$$

gdzie $\upsilon = 0,1,2,\ldots$ jest kwantową liczbą oscylacji. Różnice poziomów energetycznych wynoszą:

$$\Delta E_{osc} = E_{\upsilon+1} - E_{\upsilon} = h\nu = \hbar\sqrt{\frac{f}{m_r}}.$$

Różnice te są zawsze równe, zatem poziomy energetyczne są od siebie równo oddalone. Dozwolone są tylko przejścia między sąsiednimi poziomami energetycznymi (reguła wyboru: $\Delta\upsilon = \pm 1$). Zależność energii potencjalnej od wychylenia dla oscylatora harmonicznego przedstawia rysunek 6.18.

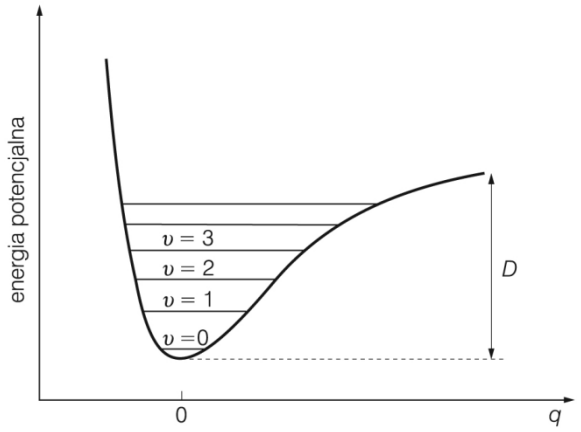


Rys. 6.18. Krzywa energii potencjalnej w modelu oscylatora harmonicznego [3].

Oscylacje w rzeczywistych cząsteczkach trudno opisać za pomocą modelu harmonicznego, Wiązania chemiczne łączące atomy w cząsteczkach nie są nieskończenie trwałe. Przy dostatecznie dużych odległościach między atomami, następuje ich zerwanie. Cząsteczka wówczas ulega dysocjacji. Do opisu rzeczywistych układów oscylacyjnych używa się zatem modelu oscylatora anharmonicznego. Krzywa energii potencjalnej dla tego oscylatora nie jest parabolą, lecz krzywą Morse'a (rys. 6.19.) postaci:

$$U(q) = D[1 - \exp(-\beta q)]^2,$$

D jest energią dysocjacji cząsteczki, a parametr β określa stopień rozwarcia gałęzi krzywej.



Rys. 6.19. Krzywa energii potencjalnej w modelu oscylatora anharmonicznego [3].

Rozwiązanie równania Schrödingera dla oscylatora anharmonicznego pozwala obliczyć jego energię oscylacji:

$$E_{oscanh} = h\nu_0\left(\upsilon + \frac{1}{2}\right) - h\nu_0 x\left(\upsilon + \frac{1}{2}\right),$$

gdzie ν_0 oznacza częstość podstawową drgania, a *x* jest współczynnikiem anharmoniczności Różnica między poziomami energetycznymi w oscylatorze anharmoniczna nie jest stała:

$$\Delta E = h\nu_0\left[1 - 2x\left(\upsilon + \frac{1}{2}\right)\right] = \hbar\sqrt{\frac{f}{m_r}}\left[1 - 2x\left(\upsilon + \frac{1}{2}\right)\right].$$

Wraz ze wzrostem liczby kwantowej oscylacji, poziomy zbliżają się do siebie. Dozwolone są zatem przejścia między różnymi stanami oscylacyjnymi (reguła wyboru: $\Delta\upsilon = \pm 1, \pm 2, \pm 3, \ldots$). Najbardziej prawdopodobne przejście, przy którym $\Delta\upsilon = \pm 1$ nazywa się tonem podstawowym. Prawdopodobieństwa kolejnych przejść dla $\Delta\upsilon = \pm 2, \pm 3, \ldots$ (tzw. nadtonów) maleją wraz ze wzrostem $\Delta\upsilon$.

6.2.2 **Spektroskopia absorpcyjna w podczerwieni**

Spektroskopia w podczerwieni jest spektroskopią absorpcyjną. W badanym układzie zachodzi zjawisko absorpcji promieniowania. Układ przechodzi wówczas ze stanu *l* o niższej energii do stanu wzbudzonego *m* o wyższej energii. Prawdopodobieństwo *W* zajścia takiego procesu jest proporcjonalne do gęstości promieniowania ρ, czyli ilości fotonów w jednostce objętości badanego układu:

$$W = B_{lm}\rho,$$

B_{lm} to współczynniki Einsteina. Współczynniki te są proporcjonalne do zmiany momentu dipolowego μ w trakcie drgania normalnego cząsteczki:

$$B_{lm} \sim \left(\frac{\mathrm{d}\mu}{\mathrm{d}q}\right)^2_{q=0},$$

q oznacza współrzędną wewnętrzną drgania normalnego. Absorpcja jest zatem możliwa tylko wtedy, gdy podczas drgania atomów cząsteczki zmienia się jej elektryczny moment dipolowy. Można zapisać podstawową regułę wyboru w spektroskopii w podczerwieni jako: $\frac{\mathrm{d}\mu}{\mathrm{d}q} \neq 0$.

Intensywność pasma w widmie w podczerwieni jest proporcjonalna do $\left(\frac{\mathrm{d}\mu}{\mathrm{d}q}\right)^2$.

Podsumowując, warunki absorpcji dla spektroskopii IR są następujące:

- fotony promieniowania padającego muszą pasować do różnicy energii poziomów energetycznych;
- kwantowa liczba oscylacji musi zmieniać się podczas przejścia o wartości $\Delta v = \pm 1, \pm 2, \pm 3, \ldots$;
- musi występować zmiana momentu dipolowego cząsteczki podczas oscylacji.

Absorpcję promieniowania można również opisać w sposób ilościowy stosując prawo Lamberta-Beera:

$$I = I_0 \exp(-\varepsilon c l).$$

w którym, I_0 jest intensywnością promieniowania podczerwonego, które pada na próbkę, I intensywnością promieniowania, które przeszło przez próbkę, c jest stężeniem badanej substancji, l długością drogi optycznej, a ε współczynnikiem absorpcji. Współczynnik absorpcji zależy od stężenia substancji badanej oraz od rozpuszczalnika w którym jest umieszczona, a także długości fali promieniowania padającego.

W eksperymencie IR próbkę umieszcza się na drodze optycznej promieni podczerwonych i bada się stopień obniżenia intensywności promieniowania przez nią przechodzącego w stosunku do promieniowania padającego. Stosunek ten nazywa się transmitancją:

$$T = \frac{I}{I_0} \cdot 100\%.$$

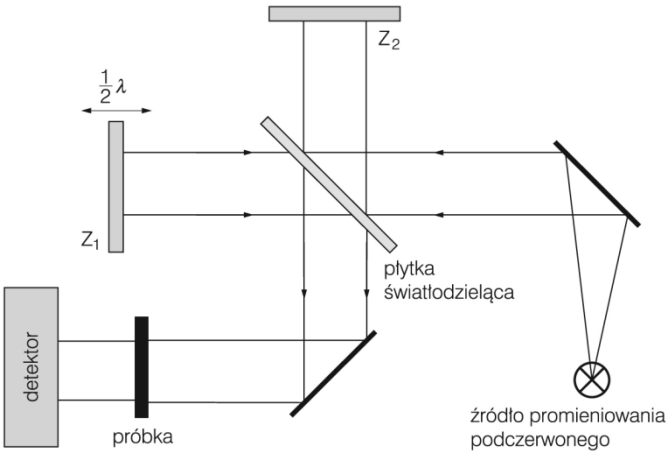
Często do opisu zjawiska osłabienia promieniowania używa się również wielkości zwanej absorbancją:

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon c l.$$

Związek między absorbancją a transmitancją jest następujący:

$$A = \log(1/T) = \log(I_0/I).$$

Widma IR przedstawiają zwykle zależność transmitancji lub absorbancji od liczby falowej $k = 1/\lambda$ wyrażonej w cm^{-1}. Spektrometr do rejestracji widm w podczerwieni przedstawiono na rysunku 6.20.



Rys. 6.20. Schemat spektrometru FTIR [3].

Głównymi elementami budowy tej aparatury badawczej są:

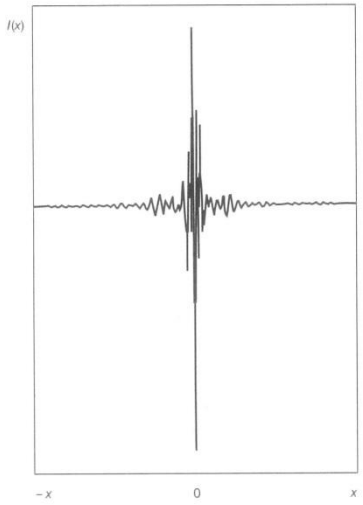
- źródło promieniowania podczerwonego (najczęściej pręt z węglika krzemu);
- pryzmat, siatka dyfrakcyjna lub interferometr (najczęściej interferometr Michelsona w spektrometrach FTIR z transformatą Fouriera);
- detektor promieniowania (najczęściej DTGS – deuterowany siarczan triglicyny).

Promieniowanie podczerwone ze źródła pada na badaną substancję, część promieniowania jest przez nią absorbowana, a pozostałą część przechodzi przez próbkę i za pomocą układu optycznego jest kierowana do siatki dyfrakcyjnej lub interferometru, a następnie do detektora. Promieniowanie skierowane na siatkę dyfrakcyjną zostaje rozszczepione, czyli uporządkowane według długości fali, a następnie jest analizowane przez detektor zmieniający sygnał optyczny na elektryczny i rejestrowane. W spektrometrach typu interferencyjnego (furierowskiego) funkcję siatki dyfrakcyjnej lub pryzmatu przejął interferometr. Promieniowanie o natężeniu $I(\nu)$ pochodzące ze źródła kierowane jest w nim na płytkę półprzepuszczalną (światłodzielącą), która rozdziela je na dwa promienie o jednakowej intensywności, jeden odbity, drugi przepuszczony przez płytkę. Promienie te biegną w dwóch prostopadłych kierunkach do zwierciadeł. Pierwszy promień biegnie do zwierciadła nieruchomego Z_2, odbija się od niego i wraca do płytki. Drugi promień biegnie do zwierciadła ruchomego Z_1. Ruch zwierciadła powoduje zmianę długości drogi optycznej, którą pokonuje ten promień. Promień następnie wraca do płytki światłodzielącej ale z pewnym opóźnieniem lub przyspieszeniem w zależności od długości drogi optycznej którą pokonał od lustra ruchomego. Nakładające się na płytce promienie „powrotne” ulegają

interferencji i tworzą sygnał zwany interferogramem, który przedstawia zależność natężenia promieniowania w zależności od różnicy dróg optycznych *x* lub czasu przesuwu zwierciadła ruchomego *t*. Natężenie promieniowania dochodzącego do detektora po wyjściu z interferometru wynosi:

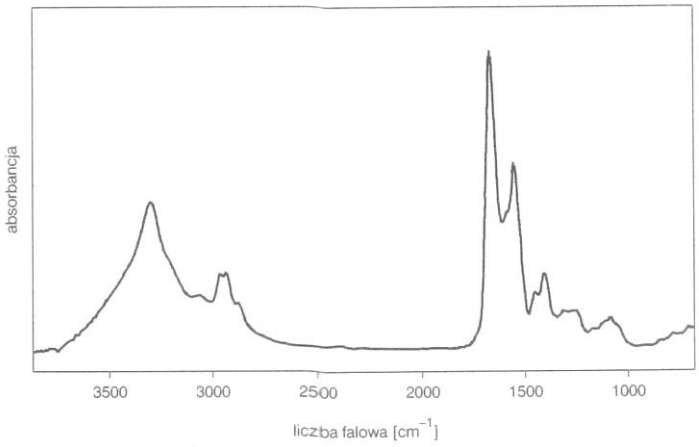
$$I(x) = \frac{1}{2}\int I(\nu)(1 + \cos 2\pi\nu x)\mathrm{d}\nu.$$

Przykład interferogramu przedstawia rysunek 6.21. Jest to niegasnąca funkcja okresowa, którą rozkłada się na szereg funkcji cosinusoidalnych, co oznacza rozkład światła polichromatycznego na składowe monochromatyczne.



Rys. 6.21. Przykład interferogramu [1].

Oddziaływanie takiego promieniowania z próbką daje sygnał, który jest funkcją zmiany długości drogi optycznej. Zastosowanie transformaty Fouriera umożliwia zmianę zależności natężenia promieniowania od wartości długości drogi optycznej na zależność natężenia promieniowania od liczby falowej. Zależność ta jest widmem FTIR. Przykładowe widmo FTIR dla albuminy przedstawia rysunek 6.22.



Rys. 6.22. Widmo FTIR albuminy [1].

Spektroskopia w podczerwieni jest wykorzystywana głównie do identyfikacji substancji chemicznych. Obecne w widmie pasma odpowiadające drganiom normalnym cząsteczki występują przy charakterystycznych dla nich liczbach falowych. Widmo w podczerwieni jest więc przysłowiowym „odciskiem palca" (ang. *fingerprint*) badanej substancji. Metoda ta ma również zastosowanie w badaniach struktury cząsteczek biologicznych np. białek. Położenie pasm amidowych (1600-1700 cm^{-1}) ma w białkach ścisły związek z ich strukturą drugorzędową, a także z konformacją wokół wiązania peptydowego.

6.2.3 **Spektroskopia Ramana**

Spektroskopia Ramana, podobnie jak spektroskopia w podczerwieni, dotyczy analizy ruchów oscylacyjnych w cząsteczkach. W tym przypadku promieniowanie z zakresu widzialnego, padające na obiekt badawczy jest na nim rozpraszane.

W 1923 roku A. Smekal przewidział, że w promieniowaniu rozproszonym powinny pojawiać się obok fotonów $h\nu_0$ fotony o częstościach różnych od częstości ν_0 promieniowania padającego. W 1925 roku H. A. Kramers i W. Heisenberg opracowali kwantowo-mechaniczną teorię rozpraszania, która potwierdzała przypuszczenia Smekala. W 1928 roku C. V. Raman, potwierdził doświadczalnie te teoretyczne rozważania obserwując ten efekt w benzenie. W 1930 roku odkrycie to zostało uhonorowane nagrodą Nobla.

Mechanizm rozpraszania Ramana opisuje się na podstawie teorii polaryzowalności Placzka. Promieniowanie elektromagnetyczne o częstości ν_0 indukuje w cząsteczce moment dipolowy $\boldsymbol{\mu}_{\text{ind}}$ proporcjonalny do natężenia składowej elektrycznej **E** tego pola:

$$\boldsymbol{\mu}_{ind} = \alpha \mathbf{E},$$

współczynnik proporcjonalności α jest polaryzowalnością elektronową cząsteczki. Wielkość drgającego indukowanego momentu dipolowego opisuje następujące wyrażenie:

$$\mu = \alpha E_0 \cos(2\pi\nu_0 t),$$

w którym $E_0 \cos(2\pi\nu_0 t)$ opisuje pole elektryczne fali o częstości ν_0 padającej na układ cząsteczek. Polaryzowalność cząsteczki zmienia się podczas ruchu oscylacyjnego atomów tworzących cząsteczkę, zmieniają się wówczas długości wiązań oraz kąty między nimi. Polaryzowalność jest więc funkcją współrzędnej normalnej q drgania:

$$\alpha = f(q).$$

Rozwijając powyższą funkcję w szereg Maclaurina i zakładając, że wychylenie q jest bliskie zeru dla dwuatomowej molekuły o jednej współrzędnej normalnej q, otrzymuje się następujące wyrażenie:

$$\alpha(q) = \alpha_{q=0} + \left(\frac{\mathrm{d}\alpha}{\mathrm{d}q}\right)_{q=0} q + \frac{1}{2}\left(\frac{\mathrm{d}^2\alpha}{\mathrm{d}q^2}\right)_{q=0} q^2 + \cdots$$

Dla założenia $q = Q\cos 2\pi\nu t$ polaryzowalność wynosi:

$$\alpha = \alpha_0 + \left(\frac{\mathrm{d}\alpha}{\mathrm{d}q}\right)_0 Q\cos 2\pi\nu t,$$

Polaryzowalność α zmienia się z częstością ν drgania normalnego, ale tyko wtedy, gdy $(\mathrm{d}\alpha/\mathrm{d}q)_0$ nie jest równe zeru, wówczas indukowany moment dipolowy ma postać:

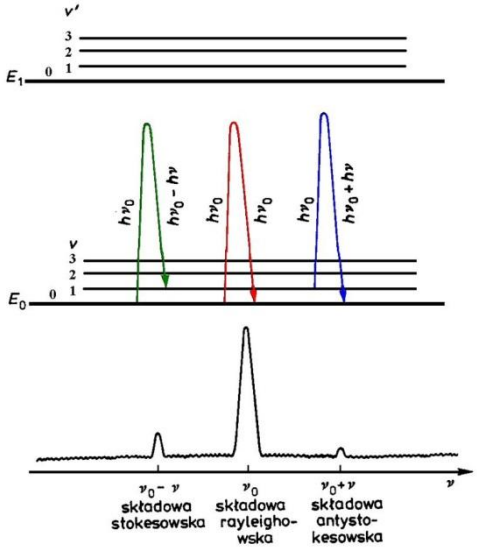
$$\mu = \alpha_0 E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) + \left(\frac{\mathrm{d}\alpha}{\mathrm{d}q}\right)_0 Q E_0 \cos 2(\pi\nu_0 t)\cos(2\pi\nu t),$$

Ostateczną postać indukowanego momentu dipolowy po zastosowaniu odpowiedniego wzoru trygonometrycznego można przedstawić za pomocą następująco:

$$\mu = \alpha_0 E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) + \frac{1}{2}\left(\frac{\mathrm{d}\alpha}{\mathrm{d}q}\right)_0 Q E_0 \cos 2\pi(\nu_0 - \nu)t + \frac{1}{2}\left(\frac{\mathrm{d}\alpha}{\mathrm{d}q}\right)_0 Q E_0 \cos 2\pi(\nu_0 + \nu)t.$$

Z powyższego wzoru wynika, że drgający, indukowany moment dipolowy ma trzy składowe o częstościach ν, (ν_o-ν) i (ν_o+ν). Wysyła on w przestrzeń fale o trzech częstościach, z których jedna, ν_0, jest częstością promieniowania wzbudzającego, druga jest różnicą częstości ν_0 i częstości drgania normalnego ν, a trzecia sumą ν i ν_0. Stąd płynie wniosek, że promieniowanie rozproszone może mieć różną częstość w stosunku do promieniowania padającego. Jeżeli częstość promieniowania rozproszonego jest taka sama jak częstość promieniowania padającego w widmie światła rozproszonego pojawi się pasmo rayleighowskie. Jeśli natomiast częstość promieniowania rozproszonego jest mniejsza od

częstości promieniowania padającego obserwowane będzie pasmo Ramana stokesowskie. W przypadku, gdy częstość promieniowania rozproszonego jest większa od częstości promieniowania padającego w widmie wystąpi pasmo antystokesowskie (rys. 6.23.)

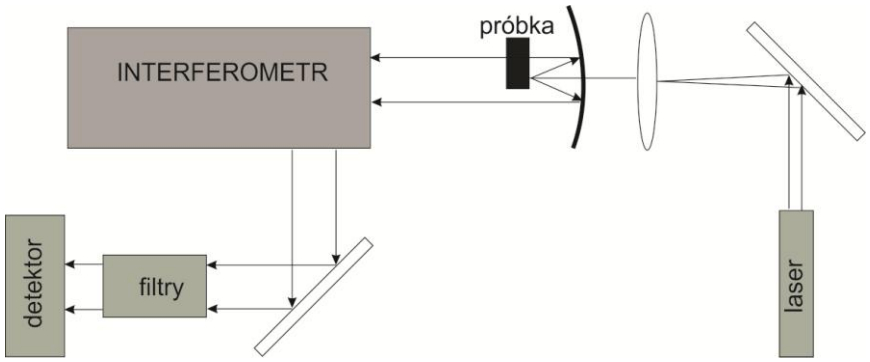


Rys. 6.23. Widmo światła rozproszonego, które zawiera pasmo rayleighowskie oraz pasma ramanowskie [2].

Rozpraszanie Rayleigha to rozpraszanie sprężyste, cząsteczka po zaabsorbowaniu promieniowania przechodzi ze stanu podstawowego do tzw. stanu wirtualnego, który znajduje się między poziomem elektronowym podstawowym a pierwszym poziomem elektronowym wzbudzonym. Energia, którą cząsteczka nabyła w wyniku oddziaływania z promieniowaniem padającym nie jest wystarczająca by osiągnąć wzbudzony stan elektronowy. Następnie cząsteczka ze stanu wirtualnego powraca do stanu podstawowego. Energia promieniowania rozproszonego jest taka sama jak promieniowania padającego. Składowe stokesowska i antystokesowska są efektem rozpraszania niesprężystego. W przypadku składowej stokesowskiej cząsteczka przechodzi ze stanu podstawowego do stanu wirtualnego, lecz powraca na wyższy niż pierwotnie poziom oscylacyjny. Cząsteczka generująca pasmo antystokesowskie przechodzi do poziomu wirtualnego z wyższego poziomu oscylacyjnego, a powraca na poziom podstawowy.

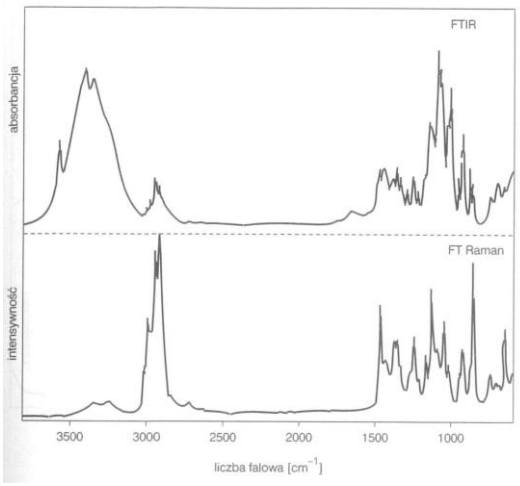
Stosowalność teorii polaryzowalności Placzka wymaga spełnienia następujących warunków: $\nu_{osc} << \nu_0$, $\nu_{osc} << \nu_{el}$, $\nu_{osc} << \nu_{el} - \nu_0$. Warunki te są spełnione, gdy wzbudzenie odbywa się za pomocą promieniowania widzialnego, $\nu \approx 25000$ cm^{-1} w substancjach bezbarwnych, czyli w takich, w których pierwszy wzbudzony poziom elektronowy jest oddalony o $\nu \approx 30000$ cm^{-1} od poziomu podstawowego oraz gdy występuje zmiana polaryzowalności cząsteczki w czasie drgania normalnego tj. $(d\alpha/dq) \neq 0$.

W spektroskopii Ramana do wzbudzenia cząsteczek używa się monochromatycznego promieniowania, które padając na próbkę ulega rozproszeniu. Źródłem światła stosowanym w tej metodzie jest najczęściej laser Nd-YAG generujący wiązkę światła o długości fali 1064 nm. Promieniowanie rozproszone jest zbierane za pomocą detektorów krzemowych lub germanowych oraz fotopowielaczy. Podobnie jak w spektroskopii w podczerwieni do monochromatyzacji promieniowania padającego jest używany interferometr lub w starszych modelach spektrometrów siatki dyfrakcyjne lub pryzmaty. Ważne jest by materiały z których wykonane są układy optyczne były przepuszczalne dla promieniowania podczerwonego (KBr, NaCl, CSI, CaF_2, i inne). Przykładowy schemat spektrometru Ramana z transformacją Fouriera przedstawia rysunek 6.24.



Rys. 6.24. Schemat spektrometru Ramana [3].

Analiza światła zaabsorbowanego (spektroskopia w podczerwieni) oraz światła rozproszonego (spektroskopia Ramana) umożliwiają badanie stanów oscylacyjnych cząsteczek. W badaniach cząsteczek biologicznych obie te techniki dostarczają informację o ich strukturze drugorzędowej oraz dynamice molekularnej. Ze względu na reguły wyboru w widmie Ramana aktywne są drgania symetryczne względem środka symetrii na przykład w szkielecie węglowym, natomiast drgania asymetryczne grup funkcyjnych będą widoczne w widmach w podczerwieni. Oba rodzaje widm uzupełniają się wzajemnie. Przykładowe widma Ramana oraz w podczerwieni sacharozy przedstawia rysunek 6.25.



Rys. 6.25. Widmo Ramana i w podczerwieni sacharozy [1].

6.3 Spektroskopia UV-VIS

Spektroskopia absorpcyjna UV-VIS dotyczy badań w zakresie spektralnym światła nadfioletowego i widzialnego. Energie fotonów takiego promieniowania są rzędu 2-10 eV, a więc odpowiadają odległościom elektronowych stanów energetycznych w cząsteczkach. Elementami cząsteczek, które odpowiedzialne są za absorpcję promieniowania są chromofory – grupy atomów połączonych wiązaniami wielokrotnymi lub układ wiązań pojedynczych z wolnymi parami elektronowymi. Do najważniejszych chromoforów biologicznych zalicza się wiązanie peptydowe i aromatyczne pierścienie boczne reszt niektórych aminokwasów w białkach oraz rozlokowane w pierścieniach zasad azotowych chromofory w kwasach nukleinowych.

Spektroskopia elektronowa dotyczy stanów elektronowych cząsteczek. Elektrony w molekule poruszają się wokół jąder, posiadają więc energię kinetyczną. Z drugiej strony elektrony są przyciągane przez jądra i odpychane przez elektrony (znajdują się w polu sił elektrostatycznych), posiadają więc energię potencjalną. Elektrony poruszają się po orbitach, ruch ten można opisać za pomocą momentu pędu L:

$$L = \sqrt{l(l+1)}\hbar,$$

l = 0, 1, 2,…, n-1 jest orbitalną liczbą kwantową, odpowiadającą orbitalom s, p, d, …

Pod wpływem pola elektrycznego lub magnetycznego następuje precesja wektora momentu pędu wokół kierunku działającego pola, kąt między wektorem momentu pędu, a kierunkiem pola jest skwantowany – rzut orbitalnego momentu pędu na kierunek pola J wynosi:

$$J = m_l\hbar,$$

$m_l = l, (l-1), (l-2), \dots, 0, \dots, (-l+2), (-l+1), -l$ jest magnetyczną liczbą kwantową. Wektor momentu pędu może zatem przybierać 2*l*+1 orientacji względem kierunku pola (precesja) o danej energii. Elektron krąży wokół własnej osi – posiada zatem spin:

$$S = \sqrt{s(s+1)}\hbar,$$

gdzie kwantowa liczba spinowa s = ½. Spin elektronu może przyjmować dwie orientacje o spinowych magnetycznych liczbach kwantowych m_s = +1/2, -1/2.

Elektron w atomie może przechodzić z jednego stanu do drugiego wskutek absorpcji i emisji energii. Elektrony zajmują kolejno coraz wyższe poziomy energetyczne zgodnie z zakazem Pauliego, który mówi, że w danym atomie elektrony nie mogą mieć jednakowych wszystkich liczb kwantowych. Elektrony znajdujące się na powłokach niewypełnionych są poddawane działaniu pola elektrycznego jądra, są ekranowane dodatkowo przez obecność zamkniętych powłok. Całkowity moment pędu wszystkich elektronów atomu jest sumą wypadkowego wektora momentu pędu orbitalnego i spinu:

$$\mathbf{J} = \sum_i \boldsymbol{l}_i + \sum_i \boldsymbol{s}_i$$

$$|\mathbf{L}| = \sqrt{L(L+1)}\,\hbar$$

$$|\mathbf{S}| = \sqrt{S(S+1)}\,\hbar$$

$$|\mathbf{J}| = \sqrt{J(J+1)}\,\hbar,$$

gdzie *L* jest kwantową liczbą orbitalną wszystkich elektronów w atomie, *L*= 0, 1, 2, 3, … (termy elektronowe w atomie: S, P, D, F, …), *S* jest kwantową liczbą spinową wszystkich elektronów w atomie, która może przyjmować wartości 0, 1/2, 1, 3/2, 2, …, *J* jest kwantową liczbą całkowitego wypadkowego momentu pędu wszystkich elektronów w atomie. Każdy stan elektronowy opisany jest przez funkcję falową ψ, która określa rozkład prawdopodobieństwa znalezienia atomu w przestrzeni wokół jądra tzw. spinorbital.

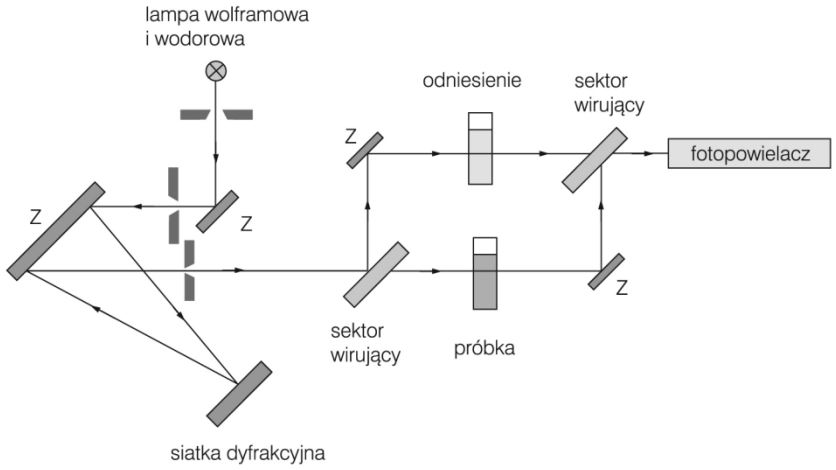
W przypadku cząsteczek, pole elektryczne ich jąder ma wyróżniony kierunek pokrywający się z liniami łączącymi jądra w molekule. W skutek przestrzennego zorientowania składowa $\boldsymbol{L}$ wzdłuż kierunku pola przybiera wartości: $M_L = L, L-1, L-2, \dots, -L$. Liczba kwantowa określająca kwantowanie orbitalnego momentu pędu w molekule wynosi $\Lambda = |M_L|$ i przyjmuje wartości Λ = 0,1,2,3,4, ..., termy elektronowe jej odpowiadające są oznaczane odpowiednio jako Σ Π Δ Φ Γ. Spiny elektronów w molekule dodają się wektorowo, tworząc wypadkowy spin $\boldsymbol{S}$, rzut S na oś międzyjądrową może przyjmować wartości $M_S\hbar$, czyli 2S+1, co nazywane jest multipletowością termu elektronowego.

Wektorowe zsumowanie rzutów orbitalnego i spinowego momentu pędu daje wypadkowy całkowity rzut momentu pędu Ω:

$$\Omega = |\Lambda + M_S|.$$

Z orbitali atomowych powstają orbitale molekularne σ, π, δ odpowiadające magnetycznej liczbie kwantowej λ=0,1,2,… są to tzw. orbitale elektronów walencyjnych w cząsteczce.

Schemat spektrometru UV-VIS przedstawiono na rysunku 6.26. Źródłem promieniowania UV-VIS jest zwykle lampa wolframowa w obszarze widzialnym i lampa wodorowa w obszarze nadfioletu lub lasery barwnikowe. Detektorem jest w spektrometrze tego typu zwykle fotopowielacz. Układy optyczne są przeważnie wykonane z kwarcu i szkła dla promieniowania widzialnego oraz z kwarcu dla nadfioletu. Monochromatyzację promieniowania uzyskuje dzięki siatce dyfrakcyjnej lub na pryzmacie. Szczelina wejściowa w monochromatorze wycina wąską wiązkę promieniowania, która następnie kierowana jest na element rozszczepiający (siatka, pryzmat). Rozszczepiona wiązka światła pada na szczelinę wyjściową, która wycina odpowiednie pasmo z dowolnej części widma. Sygnał z monochromatora jest jednocześnie przekazywany do próbki oraz roztworu odniesienia. Za pomocą fotopowielacza rejestrowany jest sygnał różnicowy.



Rys. 6.26. Schemat spektrometru UV/VIS [3].

W tym eksperymencie wyznacza się transmitację, na podstawie której oblicza się na przykład stężenia makrocząsteczek. Wykorzystuje się w tym celu prawo Lamberta-Beera, zgodnie z którym absorbancja *A* jest proporcjonalna do stężenia *c* badanej substancji oraz do drogi optycznej promieniowania w próbce – grubości absorbenta:

$$A = \varepsilon c l,$$

ε jest współczynnikiem absorpcji. Współczynnik ten w maksimum absorpcji jest proporcjonalny do prawdopodobieństwa przejścia cząsteczki P oraz powierzchni chromoforowej a:

$$\varepsilon = kPa,$$

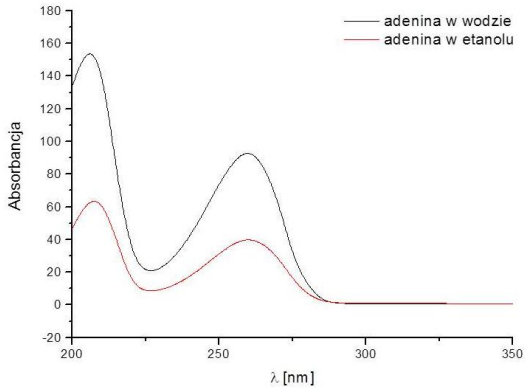
k jest stałą rzędu 10^{20}. Powierzchnia chromoforowa jest definiowana jako przekrój cząsteczki, w który musi trafić foton, aby mogło wystąpić wzbudzenie elektronów. Prawdopodobieństwo przejścia jest proporcjonalne do momentu przejścia Q:

$$Q = \int \psi_1 \boldsymbol{x} \psi_2 \mathrm{d}\nu,$$

czyli zależy od łatwości przejścia elektronu z najwyższego zajętego orbitalu ψ_1 na najniższy nie zajęty orbital ψ_2, od wzajemnego położenia orbitali ψ_1i ψ_2 oraz ich orientacji względem wektora **x** określającego kierunek fali świetlnej. Na podstawie tej zależności określone są reguły wyboru dla widm elektronowych, które są następujące:

- fotony promieniowania padającego muszą pasować do różnicy energii elektronowych poziomów energetycznych (orbitali ψ_1i ψ_2);
- przejścia elektronowe zachodzą z większym prawdopodobieństwem wtedy, gdy orbitale ψ_1i ψ_2 nakrywają się w przestrzeni;
- absorpcja fotonu jest bardziej prawdopodobna dla cząsteczek posiadających trwały moment dipolowy;
- przejście elektronowe jest dozwolone, gdy prawdopodobieństwo absorpcji dopasowanego fotonu jest różne od zera, wówczas ΔS=0 (dozwolone są przejścia między termami o tej samej multipletowości).

Rejestrowane widma elektronowe UV-VIS są krzywymi absorpcji. Charakteryzuje się je podając długość fali, przy której występuje maksimum absorpcyjne. Przykładowe widmo UV-VIS przedstawiono na rysunku 6.27.



Rys.6.27. Widmo UV-VIS adeniny w różnych roztworach.

W związkach organicznych w stanie podstawowym elektrony mogą znajdować się na wiążących orbitalach σ i π oraz orbitalach niewiążących *n*. Elektrony te mogą ulegać wzbudzeniu pod wpływem dostarczonego kwantu energii przechodząc na orbitale antywiążące o wyższej energii σ^* i π^*. Między stanami elektronowymi mogą występować następujące przejścia absorpcyjne:

- V ← N, w wyniku których elektron zostaje przeniesiony z orbitalu molekularnego σ lub π na orbitale antywiążące σ^* lub π^* (przejścia $\sigma^* \leftarrow \sigma$, $\pi^* \leftarrow \pi$, $\pi^* \leftarrow \sigma$ lub $\sigma^* \leftarrow \pi$);
- Q ← N dotyczą przeniesienia elektronu z niewiążącej pary elektronowej na atomach tlenu lub azotu na wolne orbitale antywiążące σ^* lub π^* ($\pi^* \leftarrow n$ oraz $\sigma^* \leftarrow n$).

Spektroskopię UV-VIS stosuje się najczęściej do pomiaru stężenia roztworów, ale także do identyfikacji związków chemicznych, określania czystości związków, obserwacji wpływu podstawników lub cząsteczek roztworu na strukturę badanych związków, badania oddziaływań sterycznych w cząsteczce, badania stałych równowagi chemicznej oraz wykrywania produktów pośrednich reakcji (także nietrwałych).

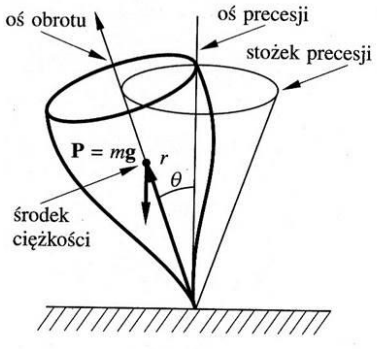
6.4 Metody Magnetycznego Rezonansu Jądrowego

Zjawisko Magnetycznego Rezonansu Jądrowego (ang. *Nuclear Magnetic Resonance* – NMR) dotyczy zachowania się jąder atomowych w polu magnetycznym. Umożliwia ona badanie makroskopowych właściwości jąder, które posiadają niezerowy moment magnetyczny i są ważne z punktu widzenia biologii i medycyny. Zalicza się do nich jądra wodoru (^{1}H), czyli protony, izotopu węgla (^{13}C), izotopu azotu (^{15}N), tlenu (^{17}O) i fosforu (^{31}P). Zjawisko NMR opisuje się zwykle na płaszczyźnie kwantowej oraz klasycznej.

6.4.1 **Podstawy zjawiska Magnetycznego Rezonansu Jądrowego**

Wszystkie substancje zbudowane są z atomów, których centralną częścią jest jądro. Podstawowymi składowymi jądra są protony i neurony. Jądra o nieparzystej ilości protonów/nieparzystej ilości neutronów/nieparzystej ilości obu nuklidów posiadają spinowy moment pędu **J** zwany spinem jądrowym. W klasycznym modelu opisującym spin jądrowy, jego zachowanie porównujemy do zachowania mikroskopowych, wirujących bąków. Po wprawieniu bąka w ruch obrotowy, gdy jego oś obrotu zostanie odchylona od pionu o kąt θ, wykonuje on ruch precesyjny. Oś obrotu takiego bąka porusza się po pobocznicy stożka

z częstością ω_p. Bąk jest bryłą sztywną o momencie bezwładności **I** i jego obrót z częstością kołową ω dookoła osi obrotu jest charakteryzowany przez moment pędu $\mathbf{J}=\mathbf{I}\omega$.

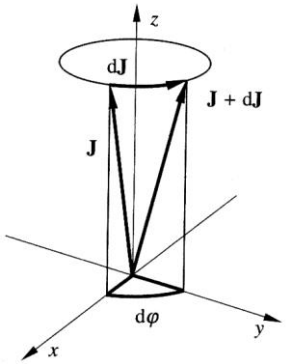


Rys. 6.28. Wirujący bąk wykonujący ruch precesyjny [14].

Równanie ruchu obrotowego bryły sztywnej ma postać:

$$\mathbf{N} = \frac{\mathrm{d}\mathbf{J}}{\mathrm{d}t},$$

gdzie **N** jest definiowane jako moment siły **P**, jaki działa na pochylony bąk o masie m ($\mathbf{N} = \mathbf{r} \times \mathbf{P}, \mathbf{P} = mg$). Moment siły o wartości $N = |\mathbf{N}| = rPsin\theta$ powoduje zmianę kierunku wektora **J**, co wywołuje ruch precesyjny po pobocznicy stożka o kącie rozwarcia 2θ (rys. 6.29.). Po upływie czasu dt położenie wektora zmieni się o $\mathrm{d}\mathbf{J} = \mathbf{N}\mathrm{d}t$ (rys. 6.29.).



Rys. 6.29. Zmiana orientacji wektora momentu pędu [14].

Prędkość kątowa precesji wynosi $\omega = \frac{\mathrm{d}\varphi}{\mathrm{d}t}$, a przyrost kąta $\mathrm{d}\varphi = \mathrm{d}|\mathbf{J}|(|\mathbf{J}|sin\theta)^{-1}$. Częstość precesji zatem będzie wynosiła:

$$\omega_p = \frac{dJ}{dt}\frac{1}{Jsin\theta} = \frac{N}{Jsin\theta} = \frac{rP}{J}.$$

Częstość precesji jest odwrotnie proporcjonalna do wartości momentu pędu oraz wprost proporcjonalna do wielkości działającego momentu siły. Jest więc jest tym większa, im cięższy jest bąk i im wyżej jest położony środek ciężkości bąka, a odwrotnie proporcjonalna do prędkości kątowej bąka.

Podobne rozważania można zastosować do spinu jądrowego. Jeśli bąk ma moment magnetyczny μ równoległy do momentu pędu **J**, w polu magnetycznym o indukcji **B** wykonuje on precesję z częstością ω_p. Kierunek precesji jest przeciwny do kierunku precesji bąka mechanicznego, gdyż moment siły $\mathbf{N_\mu} = \boldsymbol{\mu} \times \mathbf{B}$ jest przeciwnie skierowany do momentu siły $\mathbf{r} \times \mathbf{P}$. Moment magnetyczny $\boldsymbol{\mu}$ jest proporcjonalny do momentu pędu **J**:

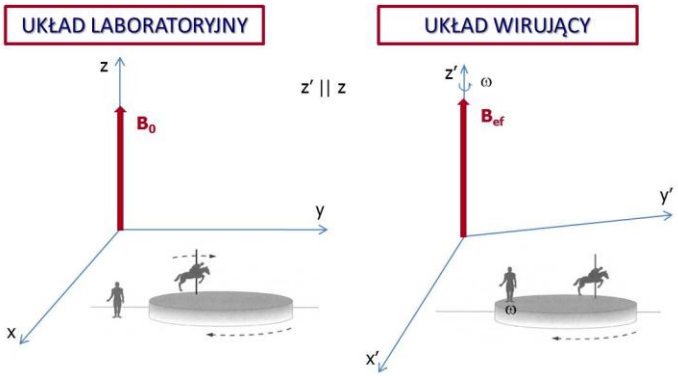
$$\boldsymbol{\mu} = \gamma \mathbf{J},$$

gdzie γ jest współczynnikiem magnetogirycznym, którego wartość jest cechą charakterystyczną jądra atomowego. Częstość precesji bąka o momencie magnetycznym μ i momencie pędu J wynosi wówczas:

$$\omega_p = \frac{\mu B}{J} = \gamma B$$

i nazywana jest częstością Larmora. Częstość precesji spinu jądrowego nie zależy od kąta θ jest natomiast proporcjonalna do indukcji pola magnetycznego.

Zjawisko rezonansu magnetycznego może być rozważne w dwóch układach współrzędnych: laboratoryjnym i wirującym (rys. 6.30.).



Rys. 6.30. Laboratoryjny i wirujący układ współrzędnych.

Laboratoryjny układ współrzędnych *x*, *y*, *z* to taki, którego oś jest równoległa do kierunku pola $\mathbf{B}_0$. Równanie ruchu wektora momentu magnetycznego $\boldsymbol{\mu}$ w stałym polu magnetycznym $\mathbf{B}_0$, który wykonuje precesję wokół kierunku pola $\mathbf{B}_0$ z częstością $\omega_0 = \gamma B_0$ ma w układzie laboratoryjnym postać:

$$\frac{1}{\gamma}\frac{\mathrm{d}\boldsymbol{\mu}}{\mathrm{d}t} = \boldsymbol{\mu} \times \mathbf{B}_0.$$

Przechodząc do wirującego układu współrzędnych *x*', *y*', *z*', który wiruje wokół osi *z*=*z*' z prędkością kątową ω względem układu laboratoryjnego równanie ruchu wektora momentu magnetycznego $\boldsymbol{\mu}$ ma postać:

$$\left(\frac{\mathrm{d}\boldsymbol{\mu}}{\mathrm{d}t}\right)_{wir} = \gamma\boldsymbol{\mu} \times \left(\mathbf{B}_0 + \frac{\omega}{\gamma}\right).$$

W układzie wirującym moment magnetyczny wykonuje precesję wokół kierunku pola efektywnego definiowanego jako:

$$\mathbf{B}_{ef=}\mathbf{B}_0 + \frac{\omega}{\gamma}.$$

Jeżeli w układzie wirującym pole efektywne będzie równe zeru, to moment magnetyczny będzie pozostawał w spoczynku względem obserwatora ruchomego, wówczas:

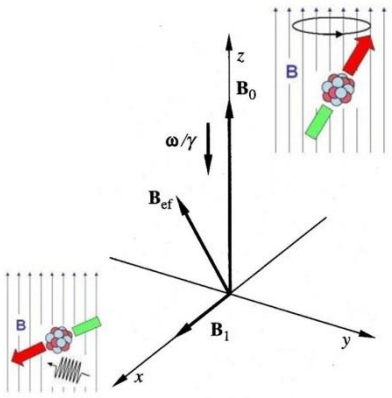
$$\mathbf{B}_0 = -\frac{\omega}{\gamma}.$$

Oznacza to, że częstość wirowania będzie równa częstości Larmora:

$$\omega = \omega_0 = -\gamma B_0.$$

Jeśli do układu przyłożone zostanie dodatkowe pole $\mathbf{B_1}$ (rys. 6.31.), dużo mniejsze od pola $\mathbf{B_0}$, o częstości ω, spełniającego warunek $B_{ef}^{(z)} \approx B_1$, to równanie ruchu wektora magnetycznego będzie miało postać:

$$\frac{\mathrm{d}\boldsymbol{\mu}}{\mathrm{d}t} = \gamma\boldsymbol{\mu} \times \left(\mathbf{B}_0 + \frac{\omega}{\gamma} + \mathbf{B}_1\right).$$



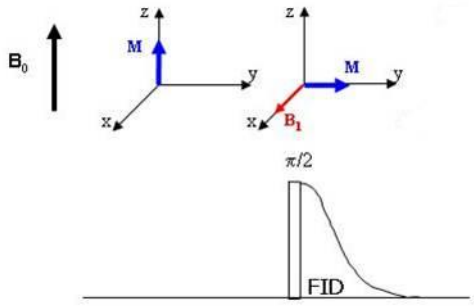
Rys. 6.31. Efektywne pole magnetyczne w układzie wirującym [14].

Pole efektywne jest sumą pól B_1 oraz $B_{ef}^{(z)}$. Gdy częstość wirowania układu jest równa częstości Larmora ($\omega = \omega_0$), wtedy $\mathbf{B_1}$ jest jedynym polem widzianym przez moment magnetyczny. Wektor ten będzie więc precesował wokół kierunku tego pola z częstością $\omega_1 = \gamma B_1$. Częstość ω_1 jest mniejsza od częstości ω_0 ze względu na to, że pole B_1 jest dużo mniejsze od pola B_0. Zmiana orientacji wektora momentu magnetycznego względem wektora indukcji magnetycznej B_0, powoduje zwiększenie energii, którą układ momentów magnetycznych czerpie z oscylującego pola B_1 – następuje zatem absorpcja energii, która jest miara rezonansu.

Suma wektorowa wszystkich spinowych momentów magnetycznych poszczególnych jąder zawartych w danej jednostce objętości próbki $\boldsymbol{V}$ nazywana jest magnetyzacją lub namagnesowaniem:

$$\mathbf{M} = 1/V \sum_{i}^{N} \boldsymbol{\mu}_i.$$

Przyłożenie pola B_1 o częstości odpowiadającej częstości Larmora, powoduje zmianę orientacji wektorów momentów magnetycznych układu względem kierunku stałego pola B_0. Na skutek tego, wektor magnetyzacji odchyla się o dany kąt α (najczęściej 90 lub 180°) od kierunku osi z. Powstaje wówczas niezerowa składowa magnetyzacji w kierunku *xy*, zwana magnetyzacją poprzeczną M_{xy}. Rejestrując odpowiednie efekty oddziaływania spinów otrzymuje się sygnał swobodnej precesji (FID - ang. *Free Induction Decay*). Schemat powstawania magnetyzacji poprzecznej oraz sygnału swobodnej precesji przedstawiono na rysunku 6.32.



Rys. 6.32. Powstawanie magnetyzacji poprzecznej oraz sygnału swobodnej precesji.

Proces dochodzenia układu do równowagi termodynamicznej po zakończeniu działania pola B_1 nazywa się relaksacją i opisywany jest przez równanie Blocha postaci:

$$\frac{\mathrm{d}\mathbf{M}}{\mathrm{d}t} = \gamma(\mathbf{M} \times \mathbf{B}) - \mathbf{i}\frac{M_x}{T_2} - \mathbf{j}\frac{M_y}{T_2} - \mathbf{k}\frac{M_z - M_0}{T_1}.$$

Pierwszy człon tego równania opisuje oddziaływanie zewnętrznego pola magnetycznego B_0 z momentami magnetycznymi, natomiast kolejne człony relaksacyjne opisują oddziaływanie wektora magnetyzacji z polami lokalnymi. Stałe czasowe T_1 i T_2 nazywane są czasami relaksacji odpowiednio podłużnej (spin-sieć) oraz poprzecznej (spin-spin). Charakteryzują one procesy relaksacji związane z wymianą energii spinów z otoczeniem – siecią (T_1), którego skutkiem jest odrost magnetyzacji wzdłuż osi z oraz wymianą energii między spinami, co powoduje zanik magnetyzacji poprzecznej z czasem (T_2). Powrót wektora magnetyzacji do stanu równowagi opisują równania:

$$M_z = M_0\left[1 - \exp\left(-\frac{t}{T_1}\right)\right]$$

$$M_y = M_0\left(-\frac{t}{T_2}\right),$$

w których wielkości M_0 są wartościami składowej podłużnej lub poprzecznej wektora namagnesowania w chwili t = 0, czyli w momencie wyłączenia pola $\mathbf{B}_1$. Pole $\mathbf{B}_1$ często nazywane jest radioimpulsem, gdyż jego częstotliwość odpowiada zakresowi fal radiowych (MHz) i jest włączane tylko na krótki okres czasu.

Zjawisko Magnetycznego Rezonansu Jądrowego można również opisać w sposób kwantowy. Jądra atomowe posiadają moment pędu **S** zwany spinem jądrowym. Spin jest wielkością skwantowaną, jego wartość zależy od kwantowej liczby spinowej I:

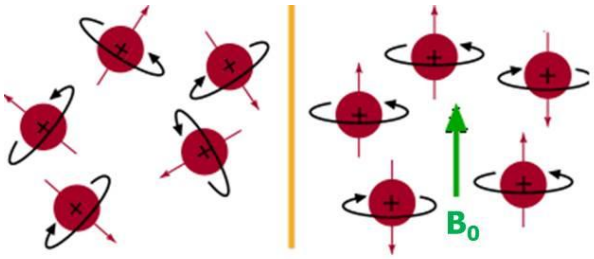
$$|S| = \hbar\sqrt{I(I+1)},$$

która może przyjmować wartości I = 0, 1/2, 1, 3/2, 2, 5/2,... Jądra o nieparzystej liczbie neutronów lub protonów posiadają niezerowy moment pędu oraz związany z nim moment magnetyczny μ:

$$\mu = \gamma\hbar\sqrt{I(I+1)}.$$

W izolowanych jądrach spiny są nieuporządkowane, a ich kierunki mają rozkład statystyczny Energie poszczególnych stanów spinowych w takim układzie mają jednakową wartość.

W zewnętrznym stałym polu magnetycznym o indukcji B_0 następuje porządkowanie się spinów (rys. 6.33.).



Rys. 6.33. Porządkowanie się spinów w polu magnetycznym.

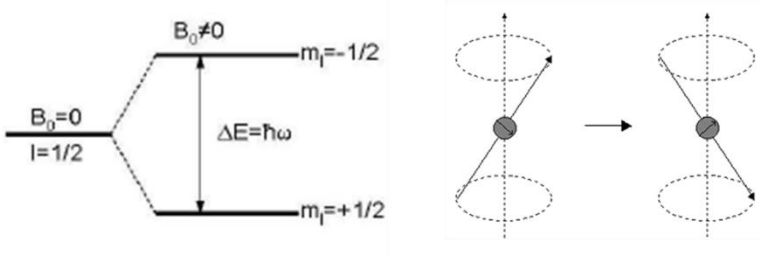
Ze względu na kwantowanie kierunku, dozwolone są tylko takie ich położenia, dla których rzut spinu na kierunek wektora indukcji magnetycznej spełnia warunek:

$$S_z = m_I\hbar,$$

m_I jest magnetyczną liczbą kwantową, która może przybierać wartości I, I-1, ..., -I. Liczba możliwych orientacji spinu wynosi 2I + 1. W polu B_0 znika degeneracja stanów spinowych, a wartość energii Zeemana oddziaływania momentu magnetycznego jądra z zewnętrznym polem magnetycznym dla poszczególnych możliwych wartości rzutów jest równa:

$$E = -\mu \cdot \mathbf{B}_0 = -B_0\mu_z = -B_0\gamma\hbar I_z.$$

Jądrowy efekt Zeemana powoduje zatem, że poziomy energetyczne jąder posiadających różny od zera moment magnetyczny ulegają rozszczepieniu pod wpływem zewnętrznego pola magnetycznego. Każdy z poziomów energetycznych jądra rozszczepia się na $2I + 1$ poziomów, które opisuje magnetyczna liczba kwantowa. Schematycznie, rozszczepienie poziomów energetycznych pod wpływem pola B_0 przedstawiono na rysunku 6.34.



Rys. 6.34. Jądrowy efekt Zeemana.

Przyłożenie dodatkowego zmiennego pola elektromagnetycznego B_1 o częstości odpowiadającej częstości Larmora powoduje rezonansowe przejścia między skwantowanymi poziomami energetycznymi momentu magnetycznego jądra, którym towarzyszy absorpcja lub emisja promieniowania elektromagnetycznego o częstości ω, spełniającego warunek:

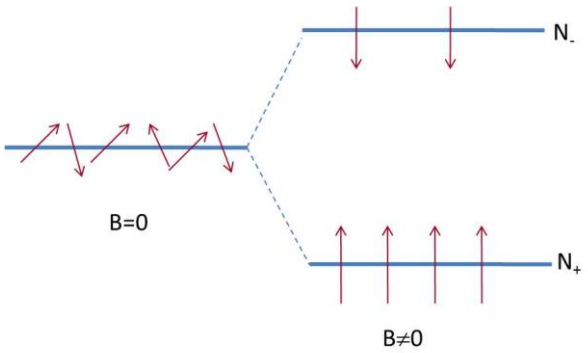
$$\Delta E = \gamma\hbar B_0 = \omega\hbar.$$

Częstość Larmora (ω) jest definiowana jako częstość precesji momentu magnetycznego jądra wokół kierunku pola magnetycznego $\mathbf{B}_0$.

Obsadzeniem poziomów energetycznych rządzi rozkład Boltzmanowski:

$$\frac{N_+}{N_-} = \exp\left(\frac{\mu B}{kT}\right) \approx 1 + \frac{\mu B}{kT}.$$

Nierówne obsadzenie poziomów pozwala na obserwację rezonansu, gdyż tylko obecność nadmiaru spinów ustawionych równolegle do pola powoduje powstanie mierzalnej makroskopowej magnetyzacji (rys. 6.35.).



Rys. 6.35.Obsadzenie poziomów energetycznych – efekt Zeemana.

Zgodnie z prawem Curie, im wyższe pole magnetyczne tym większe obsadzenie poziomów, im niższa temperatura tym wyższą wartość posiada magnetyzacja:

$$M_0 = C\frac{B_0}{T},$$

gdzie *C* jest stałą.

Przyłożenie impulsu RF powoduje, że znika składowa *z* magnetyzacji, co oznacza to, że spiny zaabsorbowały energię i część z nich przeszła ze stanu energetycznie niższego na wyższy – dążąc do wyrównania obsadzeń poziomów energetycznych. Powrót do równowagi zapewnia: emisja spontaniczna oraz procesy relaksacyjne.

Teoria relaksacji jądrowej BPP (Bloembergen, Purcell, Pound – 1948) opisuje zależność szybkości procesów relaksacyjnych zachodzących w układach spinowych od szybkości ruchów molekularnych (translacyjnych i rotacyjnych) występujących w badanych ukąłdach molekularnych. Ruchy te nie wpływają jednak bezpośrednio na orientację momentów magnetycznych. Odbywa się ona na skutek obecności oddziaływań magnetycznych i elektrycznych prowadzących do zmiany pól lokalnych jądra. Na efektywność procesów relaksacji jądrowej istotny wpływ mają:

- oddziaływania dipolowe;
- anizotropia przesunięcia chemicznego;
- oddziaływanie skalarne;
- oddziaływanie kwadrupolowe;
- oddziaływanie z niesparowanymi elektronami.

Oddziaływanie między dipolami magnetycznymi w układzie prowadzi do powstania dodatkowego, lokalnego pola magnetycznego, w którym znajdują się spiny sąsiednich jąder. Pole to zależy od odległości *r* między dipolami oraz od wartości kąta θ między kierunkiem pola magnetycznego $\mathbf{B_0}$ a wektorem **r** łączącym dwa dipole. Jest ono postaci:

$$B_{loc} = \frac{\mu_0}{4\pi}\frac{\mu_z(2\cos^2\theta - 1)}{r^3}.$$

Gdy $\cos^2\theta = 1/3$ pole lokalne równa się zero, a kąt θ=54°44′, przy którym obserwuje się to zjawisko nazywa się kątem magicznym. Dla wszystkich pozostałych kątów obserwuje się w ciele stałym rozszczepienie linii rezonansowych, w cieczach jego brak na skutek uśrednienia pól lokalnych spowodowanych obecnością ruchów Browna, natomiast poszerzenie linii widoczne jest w przypadku materiałów amorficznych.

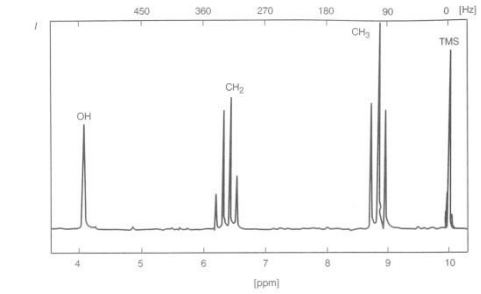
Jądra atomowe znajdujące się w polu magnetycznym B_0 są ekranowane przez otaczające je chmury elektronowe. W związku z tym znajdują się one w efektywnym polu magnetycznym $\mathbf{B}_{ef}$:

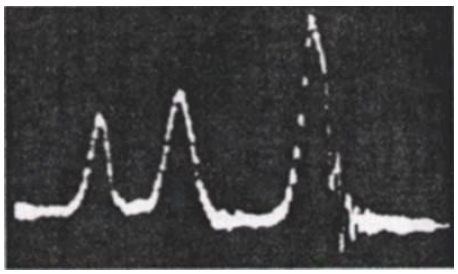
$$\mathbf{B}_{ef} = \mathbf{B}_0(1 - \sigma),$$

gdzie σ jest stałą ekranowania. W takich warunkach zmienia się warunek rezonansu dla poszczególnych jąder, czego konsekwencją jest przesunięcie częstości rezonansowej, zwane przesunięciem chemicznym. Przesuniecie to definiuje się jako różnicę między stałymi ekranowania lub częstościami rezonansowymi w zewnętrznym polu magnetycznym:

$$\sigma = \sigma_{\text{wzorca}} - \sigma_{\text{próbki}} \frac{\omega_{\text{próbki}} - \omega_{\text{wzorca}}}{\omega_0},$$

gdzie ω_0 jest częstością rezonansową badanego jądra. Dzięki temu parametrowi możliwa jest obserwacja w badanej substancji pojedynczych jąder lub grup jąder i wpływu na nie ich otoczenia. Rysunek 6.36. przedstawia widmo ^{1}H NMR etanolu, z widocznie rozdzielonymi liniami związanymi z poszczególnymi grupami występującymi w tej cząsteczce.





Rys. 6.36. Widmo NMR alkoholu etylowego wykonane za pomocą nowoczesnego spektrometru NMR oraz pierwsze widmo NMR alkoholu etylowego wykonane przez Arnolda w 1951 roku [1, 12].

Oddziaływaniem skalarnym (spin-spin, J) nazywa się oddziaływanie między dwoma jądrami, przenoszone przez łączące te jądra pary elektronowe. Oddziaływanie to jest niezależne od wielkości i kierunku zewnętrznego pola magnetycznego. Energia takiego układu spinów jądrowych zależy od zwrotów spinów jądrowych, na które to wpływ ma obecność elektronów tworzących między nimi wiązanie. W wyniku tego, pojawia się zróżnicowanie częstości przejść, co prowadzi do rozszczepienia linii rezonansowych. Miarą

tego oddziaływania jest stała sprzężenia J [Hz]. Przy sprzężeniu jądra A z n-równoważnymi jądrami X (AX_n) otrzymuje się n+1 linii rezonansowych odległych od siebie o J_{AX}.

Jądra o spinie I > 1 posiadają oprócz momentu magnetycznego **μ** także moment kwadrupolowy **Q** definiowany jako:

$$Q = \frac{1}{e}\int \rho r^2(3\cos^2\theta - 1)\mathrm{d}^3 r,$$

e jest ładunkiem elementarnym, ρ gęstością ładunku jądrowego w elemencie objętości d^3r, znajdującego się w odległości r od środka jądra, a θ jest kątem jaki tworzy wektor r z osią spinu. Jądra takie charakteryzują się niesymetrycznym rozkładem ładunku i w związku z tym przybierają kształt wydłużonych lub spłaszczonych elipsoid. Oddziaływanie kwadrupolowe jest wynikiem obecności asymetrycznego jądra w niejednorodnym polu elektrycznym opisywanym przez potencjał V i wytwarzanym przez znajdujące się w jego pobliżu elektrony i jony. Energia asymetrycznego jądra zależy od jego orientacji w przestrzeni i wynosi:

$$E_Q = \int \rho(r)V(r)\mathrm{d}^3 r.$$

W wyniku obecności oddziaływania elektrostatycznego poziomy energii przesuwają o:

$$\Delta E_Q = \frac{1}{16\pi\varepsilon_0} eQ\frac{\partial^2 V}{\partial z^2}(3\cos^2\theta - 1/2).$$

Oddziaływanie z niesparowanymi elektronami jest związane ze sprzężeniem spinu jądrowego z momentem magnetycznym niesparowanego elektronu posiadającego spin ½. Oddziaływanie to jest bardzo silne ze względu na to, że moment magnetyczny elektronu jest około 1000 razy większy od momentu magnetycznego jądra. W oddziaływaniu tym wyróżnia się dwa mechanizmy: oddziaływanie dipolowe oraz oddziaływanie kontaktowe Fermiego (izotropowe sprzężenie między elektronem a jądrem powstające wówczas gdy prawdopodobieństwo przebywania elektronu opisane przez odpowiednia funkcję rozkładu – orbital molekularny, ma skończoną wartość). Oddziaływanie to prowadzi do powstania relaksacji paramagnetycznej w układzie.

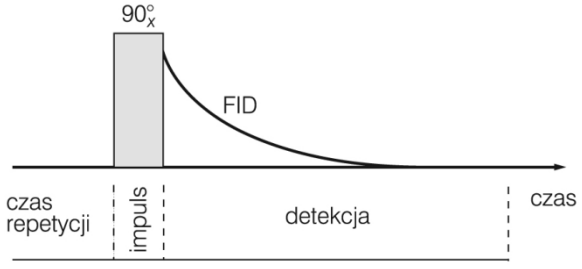
W eksperymencie NMR stałe, jednorodne pole magnetyczne $\mathbf{B}_0$ wytwarzane jest za pomocą magnesów. Obecnie wykorzystuje się do tego celu magnesy nadprzewodzące, zbudowane z solenoidu nadprzewodzącego, którego cewka ma temperaturę wrzenia ciekłego helu (4,2 K). Magnesy te wytwarzają silne (1,5 T – 21 T) i jednorodne pole magnetyczne z dokładnością do 10^{-6} T, które umożliwiają uzyskanie optymalnej rozdzielczości i czułości. Wadą tego typu magnesów jest obecność pola rozproszonego (dla 1,5 T ok. 10 m), kosztowne

utrzymanie (chłodzenie ciekłym azotem i helem), nagłe awarie podczas których dochodzi do utraty właściwości nadprzewodzących oraz duża masa.

Źródłem promieniowania elektromagnetycznego z zakresu fal radiowych (pole $\mathbf{B}_1$) jest cewka, przez którą płynie prąd zmienny o częstości ω_{RF}. W cewce tej umieszczona jest badana próbka. Jądra atomowe w próbce badanej substancji absorbują promieniowanie elektromagnetyczne emitowane przez cewkę wtedy, gdy spełniony jest warunek rezonansu:

$$\omega_{RF} = \omega_L,$$

czyli w przypadku, gdy częstość ta jest równa częstość Larmora. Dochodzi wówczas do wymiany energii między dwoma układami sprzężonymi, cewką i jądrami. Jądra substancji badanej absorbują podczas rezonansu promieniowanie elektromagnetyczne, a tym samym zwiększa się obsadzenie wyższego poziomu energetycznego. Włączenie prądu zmiennego w cewce powoduje powstanie w niej zmiennego pola $\mathbf{B}_1$. Kierunek tego pola jest prostopadły do kierunku pola $\mathbf{B}_0$. Efektywne pole, w którym znajdują się badane w eksperymencie jądra jest więc sumą pól $\mathbf{B}_0$ i $\mathbf{B}_1$, wokół którego precesuje wektor magnetyzacji. W chwili rezonansu wektor ten obraca się wokół kierunku pola $\mathbf{B}_1$ (w wirującym układzie współrzędnych). Czas trwania rezonansu determinuje kąt o jaki obróci się wektor magnetyzacji w czasie precesji. Wartość tego kąta jest miarą czasu trwania radioimpulsu (np. 90º). Fazą impulsu jest kąt jaki tworzy kierunek zmiennego pola magnetycznego $\mathbf{B}_1$ z osią *x*' wirującego układu współrzędnych. Po wyłączeniu radioimpulsu następuje proces relaksacji – jądra wracają do stanu równowagi, oddając nadmiar zaabsorbowanej energii. Wektor magnetyzacji zmienia swój kierunek, zmieniają się składowe w płaszczyźnie cewki (*x* i *y* w laboratoryjnym układzie współrzędnych) tego wektora, co powoduje indukcję prądu zmiennego w cewce i powstaje sygnał elektryczny nazywany sygnałem swobodnej precesji (FID). Cewka ta ze względu na swoje zadania nazywana jest cewką nadawczo-odbiorczą. Sygnał ten zapisywany jest w funkcji czasu, a następnie może być za pomocą transformacji Fouriera przekształcany do postaci częstotliwościowej, czyli widma. Uproszczony schemat eksperymentu NMR przedstawiono na rysunku 6.37.



Rys. 6.37. Schemat eksperymentu NMR [3]

Eksperyment taki składa się z zespołu impulsów włączanych i wyłączanych w pewnych odstępach czasu. Czas trwania oraz rodzaj impulsów stosowanych w określonej sekwencji impulsów pomiarowych zależy od oddziaływań fizycznych w badanym układzie. Sekwencje takie są powtarzane z tzw. czasem repetycji mierzonym od zakończenia detekcji sygnału do rozpoczęcia kolejnej sekwencji impulsowej. Jest to czas potrzebnym układowi na powrót do stanu równowagi, zapewniający wykonywanie kolejnych pomiarów w takich samych warunkach. Powtarzanie sekwencji pomiarowych ma za zadanie akumulację sygnału, prowadzącą do wygaszenia szumów.

Spektroskopię NMR wysokiej zdolności rozdzielczej stosuje się do badań substancji biologicznych, białek, kwasów nukleinowych i innych dużych makrocząsteczek. Ze względu na złożoność chemiczną i strukturalną tych układów, podobieństwo monomerów w białkach i kwasach nukleinowych. ich widma protonowe są bardzo skomplikowane. Zawierają bardzo wiele linii rezonansowych, które dodatkowo mogą nakładać się na siebie. Utrudnia to ich interpretację, szczególnie odczytywanie wartości przesunięć chemicznych. Poprawę zdolności rozdzielczej spektrometrów uzyskuje się poprzez stosowanie magnesów nadprzewodzących do wytwarzania silnego i jednorodnego pola magnetycznego $\mathbf{B_1}$, akumulację widm, deuterowanie niektórych fragmentów cząsteczek i stosowanie metod eliminujących linie poprzez ich nasycenie lub poszerzenie. W 1957 roku ukazała się pierwsza publikacja, w której autorzy przedstawili widmo NMR wysokiej zdolności rozdzielczej (40 MHz) cząsteczki białka (rybonukleaza trzustki bydlęcej). Wynik tego doświadczenia przedstawia rysunek 6.38. Autorzy wyróżnili w widmie 4 grupy linii, które przypisali odpowiednim aminokwasom.

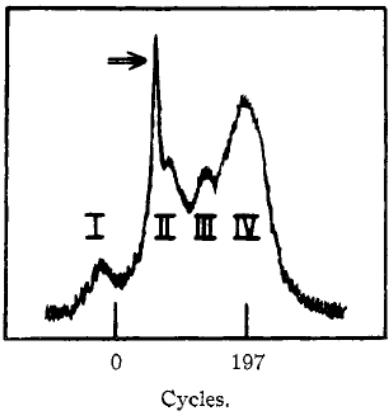


Fig. 1.—Nuclear magnetic resonance spectrum of ribonuclease.

Rys. 6.38. Widmo NMR rybonukleazy trzustki bydlęcej [17].

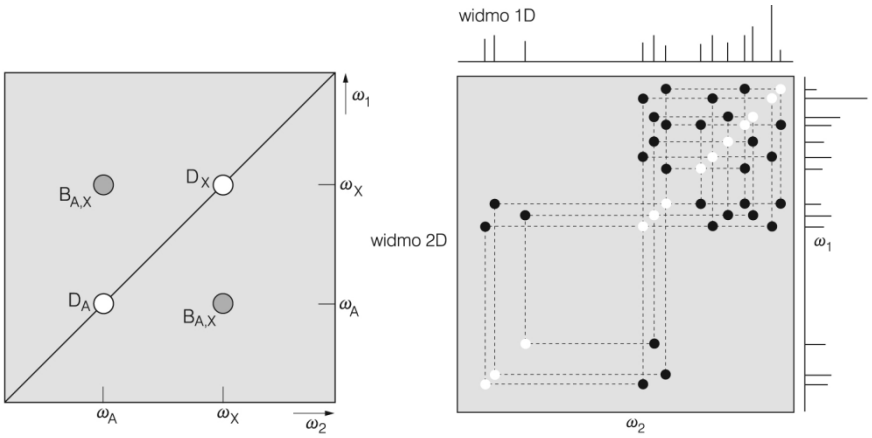
Postęp w dziedzinie badania układów biologicznych związany jest z opracowaniem eksperymentów spektroskopii wielowymiarowej NMR. Metody te umożliwiają wyznaczenie

sprzężeń między momentami magnetycznymi jąder uczestniczących w rezonansie. Sprzężenia te wynikają z oddziaływań spinowych między momentami magnetycznymi. Obrazem 2D takiego oddziaływania jest pojawienie się w widmie pików bocznych związanych z wprowadzeniem drugiego zmiennego parametru czasowego. Sygnał swobodnej precesji otrzymuje się w zależności od dwóch zmiennych czasowych, funkcję tę za pomocą dwukrotnej transformacji Fouriera przekształca się w funkcję zależną od dwóch zmiennych częstotliwościowych, czyli widmo dwuwymiarowe.

Eksperyment spektroskopii wielowymiarowej złożony jest z etapów – sekwencji impulsów pola $\mathbf{B_1}$, wielokrotnie powtarzanych w celu uzyskania odpowiedniego widma. W spektroskopii 2D NMR wyróżnia się cztery takie etapy:

- przygotowanie: układ jąder powraca do stanu równowagi po zakończeniu poprzedniego etapu, na koniec wyzwalany jest impuls $\pi/2$, który powoduje, że momenty magnetyczne wszystkich jąder zostają przeprowadzone jednocześnie do nowego stanu (stan koherentny daleki od równowagi), tzn. obrócą się o kąt 90º względem zewnętrznego pola magnetycznego – powstaje magnetyzacja poprzeczna (stan koherentny), etap ten odbywa się w czasie t_p.
- ewolucja układu momentów magnetycznych pod działaniem oddziaływań spinowych, która prowadzi do uzyskania stanu równowagi, czas trwania t_1 tego etapu zmienia się z pewnym krokiem w czasie trwania kolejnego cyklu;
- mieszanie w czasie t_m polega na sprzęganiu koherencji oraz jej transformacji na magnetyzację poprzeczną, w wyniku tego procesu występuje proces przeniesienia informacji o oddziaływaniach między momentami magnetycznymi, co umożliwia rejestrowanie korelacji między momentami magnetycznymi;
- detekcja sygnału w czasie t_2 przebiega analogicznie jak w eksperymencie jednowymiarowym.

Widmo 2D zawiera dwa rodzaje linii rezonansowych: piki diagonalne oraz piki boczne (rys.6.39.). Piki diagonalne leżą na diagonalnej widma o współrzędnych ω_1, ω_2 gdy $\omega_1 = \omega_2$ i w większości przypadków linie te odpowiadają widmu jednowymiarowemu. Piki boczne opisują korelacje między momentami magnetycznymi jąder, określone przez odziaływania między spinami.

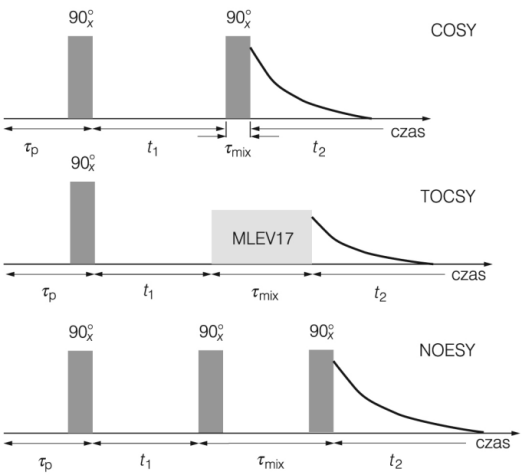


Rys. 6.39. Piki rezonansowe na widmie dwuwymiarowym NMR [3].

Istnieje kilkaset sekwencji pomiarowych stosowanych w eksperymentach wielowymiarowej spektroskopii NMR obejmujących badanie korelacji nie tylko między jądrami wodoru, ale także wodoru i węgla, wodoru i azotu. Do najpopularniejszych sekwencji dotyczących analizy korelacji między jądrami wodoru należą:

- COSY (ang. *corelation spectroscopy*) – analizuje korelacje wynikające z oddziaływania skalarnego;
- TOCSY (ang. *total corelation spectroscopy*) – analizuje korelacje wynikające z oddziaływania skalarnego;
- NOESY (ang. *nuclear Overhauser enhancement spectroscopy*) – analizuje się sprzężenie dipolowe między momentami magnetycznymi będącymi blisko siebie.

Sekwencje pomiarowe w eksperymentach COSY, TOCSY i NOESY przedstawia rysunek 6.40.



Rys. 6.40. Sekwencje impulsowe w eksperymentach 2D NMR (MLEV 17 oznacza sekwencję impulsową umożliwiającą dodatkowe sprzężenie spinów) [3].

Literatura

[1] red. A. Z. Hrynkiewicz, E. Rokita „*Fizyczne metody badań w biologii, medycynie i ochronie środowiska*”, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1999.

[2] Z. Kęcki „*Podstawy spektroskopii molekularnej*”, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1992.

[3] G. Ślósarek „*Biofizyka molekularna*”, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2011.

[4] Z. Bojarski, E. Łągiewka „*Rentgenowska analiza strukturalna*”, Wydawnictwo Uniwersytetu Śląskiego, Katowice 1995.

[5] red. W. Zieliński, A. Rajca „*Metody spektroskopowe i ich zastosowanie do identyfikacji związków organicznych*”, Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa 2000.

[6] A. Cygański „*Metody spektroskopowe w chemii analitycznej*”, Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa 2002.

[7] P. Borowski „*Wybrane zagadnienia spektroskopii molekularnej*”, Wydawnictwo UMCS, Lublin 2005.

[8] K. Pigoń, Z. Ruziewicz „*Chemia fizyczna 2. Fizykochemia molekularna*”, Wydawnictwa naukowe PWN, Warszawa 2005.

[9] A. Oleś „*Metody doświadczalne fizyki ciała stałego*”, Wydawnictwo WNT, Warszawa 1998.

[10] J. Twardowski, P. Anzenbacher „*Spektroskopia Ramana i podczerwieni w biologii*”, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1988.

[11] B. Schräder „*Infrared and Raman Spectroscopy. Methods and Applications*” VCH Weinheim, 1995.

[12] K.H. Hausser, H.R. Kalbitzer „*NMR w biologii i medycynie*”, Wydawnictwo Naukowe UAM, Poznań 1993.

[13] J. M. Janik „*Fizyka chemiczna. Dynamika molekuł na tle różnych metod badawczych*”, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1989.

[14] J. Stankowski, W. Hilczer „*Wstęp do spektroskopii rezonansów magnetycznych*”, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2005.

[15] Z. Bojarski, M. Gigla, K. Stróż, M. Surowiec „*Krystalografia*”, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2001

[16] P. W. Atkins „*Chemia Fizyczna*”, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2003.

[17] M. Saunders, A. Wishnia, J. G. Kirkwood, J.Am.Chem.Soc. **79** (1957), 3289.