

Таким образом, настоящий способ по сравнению с существующими дает возможность определять сверхмалые количества свободного ацетилхолина (до 10^{-20} г/мл) в малых навесках (1—2 мг) ткани мозга с использованием широкодоступного тест-объекта, а также аппаратуры, изготовленной из стандартных устройств, что дает возможность внедрить его в практику не только научно-исследовательских, но и лечебных учреждений.

Следует отметить, что использование в наших опытах в качестве тест-объекта медицинской пиявки, не подвергнутой комплексу описанных экстремальных воздействий, позволило повысить чувствительность метода только до 10^{-9} г/мл.

Список литературы

1. Beny J.-L. Une methode de dosage de l'acetylcholine appliquee a l'etude du ganglion sympathique cervical du rat.— J. Physiol. (Paris), 1978, 74, N 6, p. 623—631.
2. Fühner H. Ein Vorlesungsversuch zur Demonstration der Erregbarkeits-steigernden Wirkung des Physostigmins.— Arch. exp. Pathol. und Pharmacol., 1918, 82, N 1, s. 81—85.
3. Kadota K., Nagata M. Bioassay of acetylcholine with a thin muscle strip of the Japanese medical leech: a preliminary note on the reappraisal of the availability of this method.— Jap. J. Pharmacol., 1975, 25, N 5, p. 602—605.
4. Nagata M., Kadota K. Specificity of muscle response of the Japanese medical leech to acetylcholine.— Ibid, 1976, 26, N 5, p. 631—634.

Отдел физиологии ствола мозга
Института физиологии им. А. А. Богомольца
АН УССР, Киев

Поступила в редакцию
05.08.82

УДК 578.088.781

Б. С. Сушко

УСТРОЙСТВО ДЛЯ ФОРМИРОВАНИЯ И ИССЛЕДОВАНИЯ СФЕРИЧЕСКИХ ИСКУССТВЕННЫХ ФОСФОЛИПИДНЫХ МЕМБРАН

Исследованию свойств искусственных фосфолипидных мембран (ИФМ) уделяется много внимания. Для прямых измерений потока различных веществ через ИФМ вместо плоских мембран удобно использовать в опытах сферические искусственные мембраны [5, 6]. При этом площадь такой сферической ИФМ во много десятков раз больше, чем площадь плоской мембраны, обычно формируемой на отверстии во фторопластовом стаканчике. Метод сферических мембран оказался наиболее эффективным при изучении транспорта неэлектролитов через ИФМ [2, 3].

Обычно сферическую мембрану формируют на кончике стеклянной или пластмассовой пипетки. При прямых измерениях потока вещества через сферическую мембрану об изменении его концентрации внутри сферы, ограниченной мембраной, судят по разности между двумя концентрациями — начальной и конечной. Первую из них измеряют (задают) до начала опыта, вторую — через известный промежуток времени путем взятия пробы [2]. Такие упрощения в экспериментах приводят к теоретическим упрощениям, на базе которых строятся рабочие формулы для вычисления, в частности коэффициента проницаемости мембраны данному веществу. При таком подходе ошибка увеличивается тем значительнее, чем выше проницаемость мембраны для молекул исследуемого вещества. Необходимая в этом случае непрерывная регистрация изменения концентрации вещества внутри сферической ИФМ часто затруднена вследствие сложности введения датчика внутрь сферы.

Предлагаемое устройство позволяет формировать сферические искусственные мембраны, а также дает возможность непрерывно регистрировать изменения концентрации какого-либо вещества внутри сферы в любой точке ее диаметра. К веществам, регистрируемым устройством, относятся только те из них, которые можно определить полярографическим методом на твердом платиновом электроде. Кроме того, у устройства

остаются такие же возможности исследования ИФМ, которыми располагает метод плоской искусственной мембраны на отверстии.

Устройство представляет собой модифицированную пипетку для формирования сферических ИФМ, внутри которой размещены электроды и механические детали для вертикального перемещения одного из электродов.

Устройство (рис. 1) состоит из стеклянной пипетки (1), средняя часть которой в сечении овальная, вверху запаяна, а на ее нижний конец плотно надета съемная пластмассовая пипетка (2). В средней части стеклянной пипетки расположен штуцер (3),

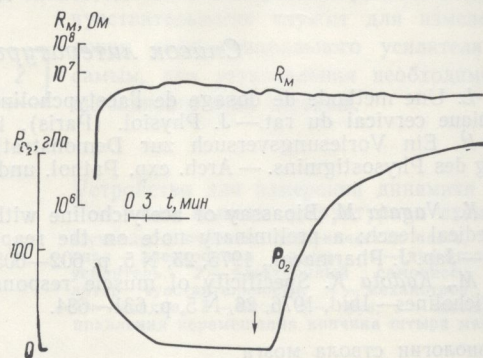
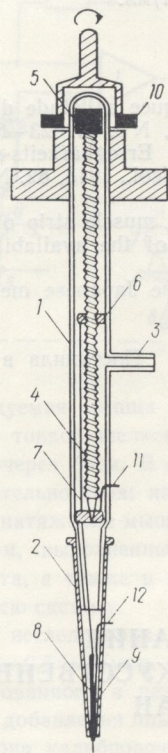


Рис. 2. Запись процесса изменения напряжения кислорода в центре сферической ИФМ диаметром 3,2 мм (вход O_2 внутрь сферы).

Стрелкой на кривой отмечено начало замены гипоксического раствора на нормоксический.

Рис. 1. Схематическое изображение устройства для формирования и исследования сферических ИФМ (обозначения в тексте).

в рабочем состоянии соединяющийся с цилиндром поршневого микроманипулятора (на рисунке не изображен). Путем микроперемещений поршня микроманипулятора происходит заполнение кончика пипетки растворами и формирование сферических ИФМ заданного диаметра. Внутри стеклянного корпуса пипетки расположен длинный металлический винт (4), свободно вращающийся вокруг своей оси. К верхней части винта прикреплен брусок ферромагнитного материала (5) — единственная ферромагнитная деталь внутри модифицированной пипетки. На винте находится гайка (6) с прикрепленной к ней тонкой упругой проволокой (7). Другой конец упругой проволоки соединен электропроводно с датчиком — платиновым электродом в стеклянной изоляции с диаметром кончика 50—100 мкм. Внутри вдоль съемной пластмассовой пипетки расположен стационарно вспомогательный электрод — хлорсеребряная проволока (9) диаметром около 100 мкм.

Устройство позволяет, не нарушая своей герметичности, перемещать платиновый электрод (8) по вертикали внутри и снаружи модифицированной пипетки с амплитудой относительно ее кончика более 2 см. Вертикальное поступательное движение электрода осуществляется благодаря вращению винта (4), который движется вслед за внешним кольцевым магнитом (10), поворачиваемого экспериментатором. Вращательное движение винта превращается в поступательное движение гайки и вместе с ней упругой проволоки с платиновым электродом-датчиком на конце. Электрические соединения электродов с внешними приборами осуществляются через клеммы (11) и (12), герметично выведенные на внешнюю поверхность соответственно стеклянной и пластмассовой части пипетки.

Устройство по своей конструкции несколько напоминает контактный термометр для автоматических термостатов. Его отличают от последнего лишь некоторые детали,

Устройство для формиро-
наличие которых вызвано
контактного термометра и
струкции.

Для полярографичес-
хлорсеребряному электроду
полярность которого выби-
ряемый при этом ток проп-
шествует калибровка тока
жанием того или иного ве-

Испытание настоящей
лорода через сферическую
мозга крупного рогатого
растворяли в хлороформ-м
ИФМ формировали на ко-
внутри термостатированной
сферы платиновый электро-
наблюдали в бинокулярный
ной) ИФМ. За это время
кулярного микроскопа, изб-
Дальнейший контроль за ф-
ны осуществляли по непре-
электроды подавали поляр-
программы кислорода. Вели-
держанию кислорода, усили-
двухканального самопишущ-
для контроля сопротивления

Для создания условий
ИФМ производили замену
кислородом воздуха (норм-
тавливаемый в сатураторе,
сферы. После достижения в-
раствор заменяли снова на
сферы. После замены раст-
динамические кривые, соотве-
На рис. 2 приведена за-
метром 3,2 мм. Диффузион-
кислорода ($гПа$, P_{O_2}).

На основании диффузи-
математической модели нест-
брану, соответствующей усл-
кислорода были рассчитаны
для кислорода. Их величина
экспериментов подтвердили
рода со стороны ИФМ.

Испытания показали, чт-
ния проницаемости сферическ-
внешних условий. Это относи-
там создания протока жидко-
мально устранены турбулент-
раствора в камере. Изменен-
ной картины внутри фосфоли-
выхода кислорода «выбросов»
практически отсутствуют (рис-
Таким образом, опыт ра-
пригодность его для формиро-
ных фосфолипидных мембран.

наличие которых вызвано назначением устройства. В частности, многие детали от контактного термометра могут быть использованы для изготовления настоящей конструкции.

Для полярографического определения концентрации веществ к платиновому и хлорсеребряному электродам необходимо приложить рабочее напряжение, величина и полярность которого выбираются в зависимости от сорта вещества и среды [4]. Изменяемый при этом ток пропорционален концентрации данного вещества. Измерению предшествует калибровка тока в единицах концентрации в растворах с известным содержанием того или иного вещества.

Испытание настоящего устройства было проведено при изучении транспорта кислорода через сферическую ИФМ. Материалом для ИФМ служили общие фосфолипиды мозга крупного рогатого скота. Фосфолипиды с холестерином в концентрации 4 % растворяли в хлороформ-метанол-декановой смеси в соотношении 3:1:2. Сферические ИФМ формировали на кончике модифицированной пипетки (в 0,2 М NaCl, pH=7,4) внутри термостатированной проточной камеры. После формирования фосфолипидной сферы платиновый электрод-датчик устанавливали в центре сферы и в течение 10—15 мин наблюдали в бинокулярный микроскоп за формированием «черной» (близкой к бислойной) ИФМ. За это время сфера почти полностью исчезала из поля видимости бинокулярного микроскопа, избыток фосфолипидов уходил вверх по поверхности пипетки. Дальнейший контроль за формированием и состоянием сферической бислойной мембраны осуществляли по непрерывному изменению ее активного сопротивления. На $Р_{O_2}$ электроды подавали поляризующее напряжение 0,55 В, соответствующее плато программы кислорода. Величину тока между $Р_{O_2}$ электродами, пропорциональную содержанию кислорода, усиливали усилителем тока ИМТ-05 и регистрировали на ленте двухканального самопишущего прибора КСПП-4. Второй канал записи использовали для контроля сопротивления мембраны.

Для создания условий направленного транспорта кислорода через сферическую ИФМ производили замену проточного раствора. Вначале раствор, уравновешенный с кислородом воздуха (нормоксический), заменяли на гипоксический раствор, приготавливаемый в сатураторе. При этом создавались условия для выхода кислорода из сферы. После достижения внутри сферы нового стационарного состояния гипоксический раствор заменяли снова на нормоксический — в этом случае кислород поступал внутрь сферы. После замены растворов на ленте самопишущего устройства регистрировали динамические кривые, соответствующие выходу и входу кислорода в сферическую ИФМ.

На рис. 2 приведена запись процесса входа кислорода в сферическую ИФМ диаметром 3,2 мм. Диффузионный ток кислорода прокалиброван в единицах напряжения кислорода (гПа, $Р_{O_2}$).

На основании диффузионной теории транспорта кислорода [1] и созданной нами математической модели нестационарной диффузии кислорода через сферическую мембрану, соответствующей условиям опыта, по динамическим кривым входа и выхода кислорода были рассчитаны коэффициенты проницаемости бислойных сферических ИФМ для кислорода. Их величина варьировала в пределах от $5,3 \cdot 10^{-6}$ до $8,7 \cdot 10^{-7}$ м/с. Данные экспериментов подтвердили наличие диффузионного сопротивления молекулам кислорода со стороны ИФМ.

Испытания показали, что применение устройства для формирования и исследования проницаемости сферических ИФМ для кислорода сопряжено с созданием стабильных внешних условий. Это относится к термостабилизации и созданию стабильных условий создания протока жидкости в камере. В проточном растворе пипетки и растворов, особенно турбулентные перемещения жидкости, малейшие изменения уровня раствора в камере. Изменения, приводящие к нарушению динамической диффузионной картины внутри фосфолипидной сферы, приводят к появлению у кривых входа — выхода кислорода «выбросов» диффузионного тока. В наших опытах «выбросы» тока практически отсутствуют (рис. 2).

Таким образом, опыт работы с описанным устройством доказывает практическую пригодность его для формирования и исследования сферических искусственных бислойных фосфолипидных мембран.