

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ  
ФЕДЕРАЦИИ  
федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего  
образования  
КРАСНОЯРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ПЕДАГОГИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ  
им. В.П.АСТАФЬЕВА  
(КГПУ им. В.П. Астафьева)

Факультет биологии, географии и химии  
Кафедра биологии, химии и экологии

ДЕРГАУСОВА ВИКТОРИЯ ВАДИМОВНА

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

Развивающие занятия для школьников по физиологии клетки на базе технопарка  
КГПУ В. П. Астафьева

Направление подготовки 44.03.05 Педагогическое образование

(с двумя профилями)

Направленность (профиль) образовательной программы

Биология и химия

ДОПУСКАЮ К ЗАЩИТЕ:

Зав.кафедрой д.б.н, профессор

Антипова Е.М. \_\_\_\_\_  
(дата,подпись)

Руководитель доцент, к.б.н кафедры  
биологии, химии и экологии

Елсукова Е. И. \_\_\_\_\_

Дата защиты \_\_\_\_\_

Обучающийся Дергаусова В. В.

\_\_\_\_\_ (дата,подпись)

Оценка \_\_\_\_\_

Красноярск, 2022

**ОГЛАВЛЕНИЕ**

ВВЕДЕНИЕ.....	3
Глава 1. Задачи Технопарка универсальных педагогических компетенций. Анализ материально-технического оснащения лаборатории генетики и биотехнологии.....	5
1.1. Оценка возможностей для проведения лабораторных развивающих занятий .....	7
Глава 2. Физиология клетки: теоретический материал к лабораторным занятиям с заданиями для актуализации знаний.....	9
2.1. Раздел «Транспорт веществ через мембрану».....	9
2.2. Раздел «Энергообмен, клеточное дыхание, дыхательный контроль».....	15
2.3. Раздел «Клеточная гибель, апоптоз».....	22
Глава 3. Лабораторные занятия по физиологии клетки для школьников на базе Технопарка КГПУ им. В.П. Астафьева.....	28
ВЫВОДЫ.....	43
Библиографический список.....	44

## ВВЕДЕНИЕ

В соответствии с федеральным проектом «Современная школа», актуальной задачей среднего общего образования на сегодняшний день является «расширение образовательного пространства за пределы конкретной школы», вовлечение школьников к участию в дополнительных образовательных модулях, факультативных занятиях, кружках по интересам, технопарках [24]. Ее решение призвано сформировать интерес к научному творчеству, современным информационным, биоинженерным технологиям, повысить мотивацию к выбору профессии в технической, естественнонаучной сферах. С учетом стремительного развития биотехнологий в 2020 г в поручении президента правительству РФ выдвинута задача создания современной системы подготовки кадров в области молекулярной и клеточной биоинженерии, начиная со школьной скамьи [8].

Прогресс в молекулярной биологии, клеточных технологиях, с одной стороны, вызывают интерес у школьников, с другой стороны, возможности школы в знакомстве с методологией исследований, в демонстрации достижений этих наук крайне ограничены. В стенах школы биология зачастую все еще предстает как что-то архаичное. Эффективным путем к преодолению этой архаичности являются создаваемые сейчас современные детские технопарки с лабораториями естественнонаучной направленности. Другим важным преимуществом занятий в технопарках является междисциплинарный подход, изучение биообъектов с актуализацией знаний по химии, физике, информатике, экологии, преодоление предметной инертности мышления.

В КГПУ им. В.П. Астафьева технопарк функционирует с весны 2022 г. и включает 8 лабораторий. Среди направлений деятельности технопарка наряду с обучением студентов, научно-исследовательской деятельностью студентов и преподавателей университета - развитие сотрудничества с образовательными учреждениями, популяризация науки в среде школьников, организация развивающих занятий для школьников, привлечение их к

научно-исследовательской деятельности.

*Цель* выпускной квалификационной работы проведение развивающих занятий по физиологии клетки среди заинтересованных обучающихся старшей школы на базе Технопарка КГПУ им. В.П. Астафьева.

Задачи ставились следующие:

1. Выявить потенциал Технопарка для проведения развивающих занятий по физиологии клетки.
2. Определить основные разделы физиологии клетки, необходимые при разработке лабораторного практикума, подготовить теоретический материал к лабораторным занятиям и задания для актуализации знаний.
3. Разработать лабораторный мини-практикум и методические рекомендации к проведению занятий.



## **Глава 1 Задачи Технопарка универсальных педагогических компетенций. Анализ материально-технического оснащения лаборатории молекулярной генетики и биотехнологии**

Задачи технопарка ориентированные на школьников, в настоящий момент, предстают в организации и проведении учебных семинаров (практические и лабораторные работы) конкурсов (научно-исследовательские и проектно-исследовательские работы), дебатов, олимпиад (в том числе подготовка к олимпиадам) и других мероприятий направленных на популяризацию науки. Во время занятий в технопарке со школьниками и будущими абитуриентами проводятся профориентационные работы, что помогает на раннем этапе определиться с направлением будущей профессии. В первую очередь бросает взор дизайн всего Технопарка, что вызывает большой интерес к самому пространству. В здании Технопарка сформирована «доступная среда», для обучающихся с ограниченными возможностями предстает возможность беспрепятственно посещать занятия.

В настоящий момент, в Технопарке расположились 8 научных лабораторий: лаборатория фундаментальной физики и альтернативных видов энергии; лаборатория практической астрономии; лаборатория нейрокогнитивных технологий и платформы «Мега-класс»; лаборатория культуры здоровья и физиологии, лаборатория робототехники и программирования; лаборатория педагогического дизайна и виртуальной реальности; лаборатория тестологии и педагогических измерений; лаборатория генетики и биотехнологий [20].

Аудитория, в которой располагается лаборатория генетики и биотехнологий, оснащена современными информационно-коммуникационными технологическими устройствами, что предоставляет возможность проводить виртуальные экскурсии, конференции заочного видео формата и очного формата с представлением презентаций. Лабораторные столы ударопрочные и устойчивые к химическим реагентам, изготовлены из прочного металлического каркаса с

полимерным покрытием, имеются удобные мягкие стулья, регулируемые по высоте, шкафы с учебно-методическими материалами и научной литературой.

Лаборатория молекулярной генетики и биотехнологии оснащена фазово-контрастным микроскопом Levenhuk MED D45T (тринокулярный), полярографическим датчиком Кларка с регистратором иономером Эксперт – 001, аппаратами и реактивами для электрофореза нуклеиновых кислот, цифровым симулятором нейронных сетей, цифровым анатомическим столом «Пирогов». Из общелабораторного оборудования имеются предметные и покровные стекла, автоматические пипетки-дозаторы, необходимый лабораторный пластик и стеклянная лабораторная посуда, холодильник. В качестве демонстрационных элементов в лаборатории имеются модели клеточного деления — митоз и мейоз, модель ДНК, широкоформатный телевизор, подключенный к компьютеру.

Таким образом, для изучения физиологии клетки особый интерес представляет работа с фазово-контрастным микроскопом и полярографическим датчиком.

### ***Фазово-контрастный микроскоп***

Лаборатория молекулярной генетики и биотехнологий использует для исследований оптическую систему Levenhuk MED 45. Главные преимущества этого фазово-контрастного микроскопа заключается в том, что возможно устанавливать в оптический путь микроскопа между объективом и окулярным тубусом дополнительные компоненты: поляризаторы и эпи-флуоресцентные осветители. Передаваемая картинка получается четкой, контрастной и ясной. Микроскоп оснащен окулярами с 10- кратным увеличением, которые дают хороший обзор и позволяют корректировать диоптрии, а если учитывать, что объективы микроскопа дают 100-кратное увеличение, то в совокупности с окулярами (10 крат) увеличение приобретает 1000-кратное. Микроскоп оснащен высококачественной камерой, что способствует вести визуальные наблюдения и одновременно записывать исследования в фото- или видео формате.



Рисунок 1.Фазово — контрастный микроскоп Levenhuk MED D45T

### *Полярограф*

Экспериментальная установка «Полярограф» для определения дыхания клеток, включает полярографический датчик Кларка с регистратором иономером Эксперт – 001 и термостатируемую ячейку объемом 1.4 мл из оргстекла для клеточной суспензии, перемешиваемой с помощью магнитной мешалки.

Главным элементом полярографического датчика является рабочий платиновый электрод, на котором при определенном значении электрического потенциала происходит восстановление кислорода до воды и генерируется электрический ток, сила которого пропорциональна растворенному кислороду [11].

#### **1.1. Оценка возможностей для проведения лабораторных развивающих занятий**

Лаборатория молекулярной генетики и биотехнологии располагает необходимым оборудованием для проведения со школьниками лабораторных

работ, научно-исследовательских проектов по физиологии клетки. Особого внимания заслуживают методы фазово-контрастной микроскопии

Фазово-контрастная микроскопия позволяет в динамике наблюдать за ростом клеточной культуры, дифференцировкой клеток, движением цитоплазмы с органеллами, функциональным состоянием клетки (стадии митоза, стресс-реакция, проявляющаяся в изменениях морфологии клеточной мембраны — блеббинге).

Определение скорости потребления кислорода (СПК) суспензией митохондрий, клеточной культурой позволяет выявить использование кислорода для окислительного фосфорилирования, оценить степень разобщения электрон-транспортной цепи, максимальный потенциал ЭТЦ, распределение  $O_2$  на процессы оксигенации в цитоплазме. Наряду с изучением механизмов окислительных процессов, СПК широко используется как интегральный показатель функционального состояния клеток при различных воздействиях, таких как температура инкубации, добавление цитокинов, гормонов, токсинов, дыхательных ядов и др.

Таким образом, при планировании занятий со школьниками необходимо учитывать не только материально-техническое оснащение лаборатории, но и возраст, и интеллектуальные возможности обучающихся.

## **Глава 2. Теоретический материал к лабораторным занятиям с заданиями для актуализации знаний**

Перед тем, как обучающимся старшей ступени обучения приступить к занятиям в лаборатории генетики и биотехнологий расположенной в Технопарке КГПУ им. В.П. Астафьева предлагается вспомнить или подкрепить свои знания, ранее полученные в школе, с помощью подобранных материалов с иллюстрациями из научно-популярной и учебной литературы и заданий предлагающиеся к ним. Так как дата и время занятий с ребятами обговаривается заранее, у обучающихся имеется время для самоподготовки и актуализации знаний (для самоподготовки рекомендуется использовать не только разработанный теоретический материал, но и стороннюю учебную литературу). Выбор разделов о физиологии клетки соответствует не только материально техническому оснащению лаборатории технопарка, но и как показывает практика в школе — личным интересам учащихся. Наибольший интерес у обучающихся старшей ступени обучения вызывает приготовление микропрепаратов, рассмотрение микропрепаратов под микроскопом, наблюдение за клетками и т.д. Одной из сложных тем в понимании у обучающихся посвящена энергетическому обмену и дыханию клеток. Было целесообразным внести теоретический материал по энергообмену и клеточному дыханию в главу для дальнейшего проведения лабораторной работы на полярографе. В целях актуализации знаний в строении эукариотических клеток, ознакомления с устройством и работой с фазово-контрастным микроскопом — рекомендуется выполнить лабораторную №1.

### **2.1. Раздел «Транспорт веществ через мембрану»**

Благодаря обычной физической диффузии, клеточная мембрана, как и

другие липидные бислои способны пропускать через себя воду и неполярные макромолекулы, однако полярные макромолекулы тоже способны проходить через мембрану, но проходят они чрезвычайно медленно.

За каждый подобный перенос ответственны специфические транспортные белки. Эти белки специфичны по своему строению, что запрограммированы переносить только определенные вещества, например, только неорганические ионы, только сахара или только определенные аминокислоты [3].

На сегодняшний день известно о существовании двух основных видов транспортных белков: белки-переносчики и каналобразующие белки, а также ионные насосы. Белки направлены на транспорт веществ через мембрану, однако многие каналобразующие и некоторые переносчики могут это делать пассивным методом «с горки» [3]. Облегченный вариант транспорта, когда молекула транспортируемого вещества не имеет заряда, тогда диффузия определяется концентрациями веществ по обеим сторонам. В случае, когда транспортируемая молекула имеет заряд, при переносе будет учитываться и электрический потенциал на сторонах мембраны, так и градиент концентрации. В совокупности двух этих препятствий образуется единый электрохимический градиент. Как правило, наружная сторона мембраны всегда заряжена положительно, а внутренняя наоборот отрицательно, тем самым препятствуя прохождению положительных заряженных ионов [6; 7].

Пассивный транспорт легко осуществляется белками-переносчиками без затрачивания энергии и происходит самопроизвольно, в то время как для активного транспорта затрачивается метаболическая энергия.

Транспортные белки, на которых имеются участки связывания для транспортируемой молекулы, могут переносить вещества с одной стороны мембраны на другую, посредством унипорта. Другие белки работают так, что перенос одного растворенного вещества зависит от сопутствующего или последовательного переноса другого вещества (либо в том же направлении) посредством симпорта, либо (в противоположном направлении) антипорта.

Например, симпорт осуществляет переносчик глюкозы, расположенный на внешней стороне клеток GLUT2 (ГЛЮТ-2), захватывает одновременно молекулу глюкозы и ион  $\text{Na}^+$  меняя конформацию, и за тем переносит оба вещества внутрь клетки [3].

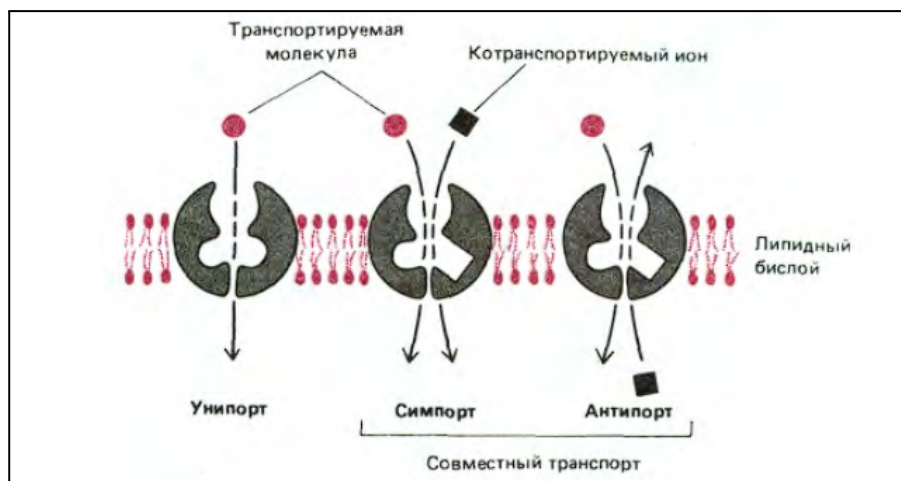


Рисунок 2. Схема работы транспорта посредством унипорта, симпорта и антипорта

Посредством унипорта работают потенциал-зависимые каналы, через который в клетку во время создания потенциала действия перемещаются ионы ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ). В процессе открывания и закрывания ионных каналов происходит сдвиг мембранного потенциала по обе стороны мембраны, за счет изменения концентрации ионов. Белки образующие каналы в мембранах клетки— порины (действуют как поры) заполненные водой. Порины имеют гидрофобную наружную поверхность и гидрофильный внутренний слой [21; 25].

Выделяют два вида ионных каналов: одни активируются в зависимости от потенциала действия на плазматической мембране и участвуют в распространении потенциала действия — потенциал-зависимые ионные каналы, другие активируются на присоединение мессенджера (внутриклеточные сигнальные молекулы) и превращают химические сигналы в электрические (работа синапсов)

лиганд-зависимые.

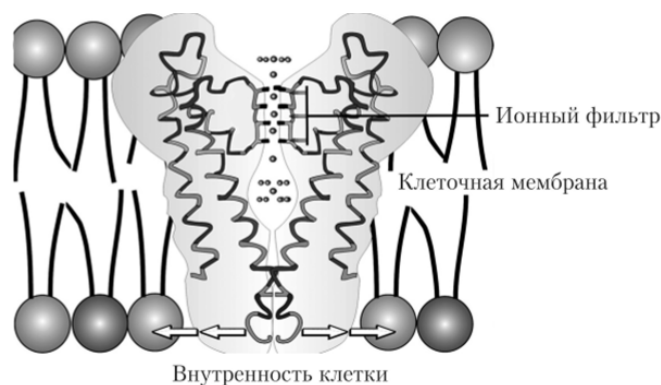


Рисунок 3. Схема ионного канала

В поддержании жизнедеятельности клетки, посредством которого играет решающую роль в образовании мембранного потенциала, является натрий/калиевые насосы ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ) на плазматических мембранах животной клетки. Насос работает по принципу антипорта, перекачивая калий в клетку и наоборот натрий из клетки по градиенту концентрации. Градиент  $\text{Na}^+$  обеспечивает регуляцию объема клетки за счет осмотического эффекта, концентрация его снаружи мембраны 10-20 раз выше, чем внутри клетки, для ионов  $\text{K}^+$  ситуация противоположна [3].

В 1957 году было установлено, что натрий/калиевый насос тесно связан с АТФ-азой (аденозинтрифосфатаза). АТФ-азы находятся на плазмалемме, тонопласте, мембранах ЭПР, аппарата Гольджи. На сегодняшний день, известны три типа ионных насосов:  $\text{Na}/\text{K}$ -АТФ-аза,  $\text{Ca}$ -АТФ-аза и протонная помпа –  $\text{H}$ -АТФ-аза. Гидролиз АТФ обеспечивает работу насоса энергией (примерно  $\frac{2}{3}$  энергии клетка тратит на поддержанием насоса, остальная энергия рассеивается в виде тепла). Механизм действия выглядит так: фосфатная группа АТФ в присутствии ионов натрия переносится на остаток аспарагиновой кислоты в молекуле АТФ-азы, а затем гидролизуется в присутствии ионов калия, что



приводит к выведению натрия из клетки, вслед за этим происходит транспорт ионов калия внутрь клетки и возвращение АТФ-азы в первичное состояние. При работе Na/K-АТФазы за счет освобождающейся энергии при гидролизе одной молекулы АТФ, в клетку переносятся два иона  $K^+$  и одновременно из клетки выкачиваются три иона  $Na^+$ . Са-АТФаза переносит два иона  $Ca^{2+}$ , протонная помпа – 2-3 протона на одну молекулу АТФ.

### ***Осмоз***

Явление осмоса, как самопроизвольной диффузии через полупроницаемую мембрану достаточно широко распространено в животных клетках. Этот процесс обеспечивает рост клеток, поддержание упругости и формы клеток. Осмотическое движение воды в клетку и из клетки зависит от двух факторов — от общей концентрации всех растворенных в воде ионов солей или молекул глюкозы по обе стороны мембраны и давления, создаваемого каждым раствором. Таким образом, чем больше концентрация вещества в растворе, тем больше создаваемое им осмотическое давление. Закон осмотического давления выражается с помощью формулы:  $\pi = i \cdot C \cdot R \cdot T$

$i$  — изотонический коэффициент раствора;

$C$  — молярная концентрация раствора (в моль/м<sup>3</sup>);

$R$  — универсальная газовая постоянная;

$T$  — термодинамическая температура раствора.


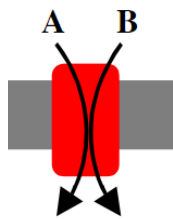
Точное и устойчивое количество электролитов помогает соблюдать равное осмотическое давление между клеткой и окружающей внеклеточной жидкостью. Таким образом, поддерживается одинаковое количество воды в тканях и подобным образом работают органы выделительной системы, фильтруя кровь и вывод мочи из организма [19].

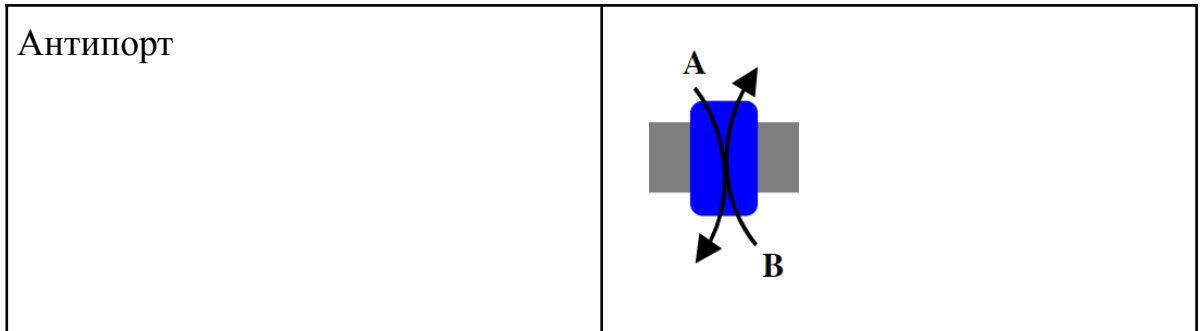
### ***Задание для актуализации знаний***

1. Соотнесите понятия к соответствующим определениям:

Диффузия	А. перенос вещества через клеточную мембрану из области низкой концентрации растворенного вещества в область высокой с затратой энергии
Осмоз	Б. самопроизвольный пассивный процесс перемещения веществ из участка большей концентрации к участку меньшей концентрации
Активный транспорт	В. движение воды через полупроницаемую мембрану из области с более низкой концентрации в область с более высокой концентрацией растворенного вещества

2. Соотнесите понятия к соответствующим изображениям:

Унипорт	
Симпорт	



3. Вставь пропущенные слова в предложение:

Если осмотическое давление внеклеточной жидкости больше, чем давление клеточной жидкости, раствор \_\_\_\_\_; если меньше – \_\_\_\_\_, если их осмотическое давление равно, то раствор \_\_\_\_\_.

4. Опишите кратко работу  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  насоса?

## 2.2. Раздел «Энергообмен, клеточное дыхание, дыхательный контроль»

Живые системы требуют постоянного притока энергии из окружающей среды для своей нормальной жизнедеятельности. Любой живой организм может существовать только при постоянном обмене питательных веществ из окружающей среды и выделении продуктов жизнедеятельности и энергии во внешнюю среду.

Высвобождение энергии происходит за счет сгорания питательных веществ этих веществ, поступающих в клетки. Химическая энергия поступающих веществ используется для образования энергии АТФ, где в дальнейшем АТФ играет роль донора свободной энергии в клетках [2].

В общих представлениях о метаболизме можно описать кратко: метаболизм это последовательные химические реакции, объединённые в один метаболический путь. Существует две стороны в метаболизме — *катаболизм* (диссимиляция, энергетический обмен, распад органических соединений) одна сторона и

**анаболизм** (ассимиляция, пластический обмен и синтез органических веществ) другая сторона. Обе эти процесса протекают одновременно и взаимосвязано: превращение веществ (последовательность ферментативных реакций) и энергетический обмен (превращение энергии) [2].

Процесс расщепления глюкозы с образованием 2 молекул пирувата называется *гликолизом* (glykys сладкий + lysis расщепление) катаболический путь (в цитоплазме), без кислорода [25]. Расщепления глюкозы и получения энергии для клеточного метаболизма состоит из стадии с затрачиванием энергии, за которой следует стадия с высвобождением энергии. Этот этап представляет собой сложный многоступенчатый процесс из десяти последовательных сложных химических реакций на мембранах ЭПР. Каждая реакция катализируется специальным ферментом, в результате которого глюкоза расщепляется до пировиноградной кислоты (ПВК) пируват. Кислородное окисление или дыхание происходит в митохондриях. Этот этап проходит в несколько параллельных процессов: 1) окисление жирных кислот; 2) окислительное декарбоксилирование пирувата, где продуктом в обоих процессах является ацетильный остаток, а электроны от окисляемых субстратов переносятся на НАД [3;6].

Пируват превращается в ацетил-КоА, (образующийся в матриксе митохондрий при участии пируватдегидрогеназы), после чего включается в цикл лимонной кислоты. Его главная составляющая роль — доставлять атомы углерода с ацетил-группой в цикл трикарбоновых кислот, чтобы они окисляются с выделением энергии. Этап превращения ПВК в ацетил-КоА является предварительным этапом цикла лимонной кислоты. Главной задачей цикла является бесперебойное обеспечение «топливом» процесса генерации энергии в митохондриях, поэтому особое значение имеет анаплеротическая реакция, заключающаяся в синтезе оксалоацетата из пирувата и  $\text{CO}_2$  [6; 7; 27].

Сам цикл лимонной кислоты начинается с оксалоацетата и им же он завершается. Ацетильная группа ацетил-КоА присоединяется к оксалоацетату. Оксалоацетат, в свою очередь, превращается в цитрат и подвергается

изомеризации в изоцитрат. Изоцитрат нестабилен, легко теряет карбоксильную группу в виде  $\text{CO}_2$ . Изоцитрат с последующими химическими реакциями превращается в  $\alpha$ -кетоглутарат (является аналогом пирувата и имеют общую формулу), сукцинат (C4), фумарат (C4), малат (C4) и, наконец, в исходный оксалоацетат [25; 27].

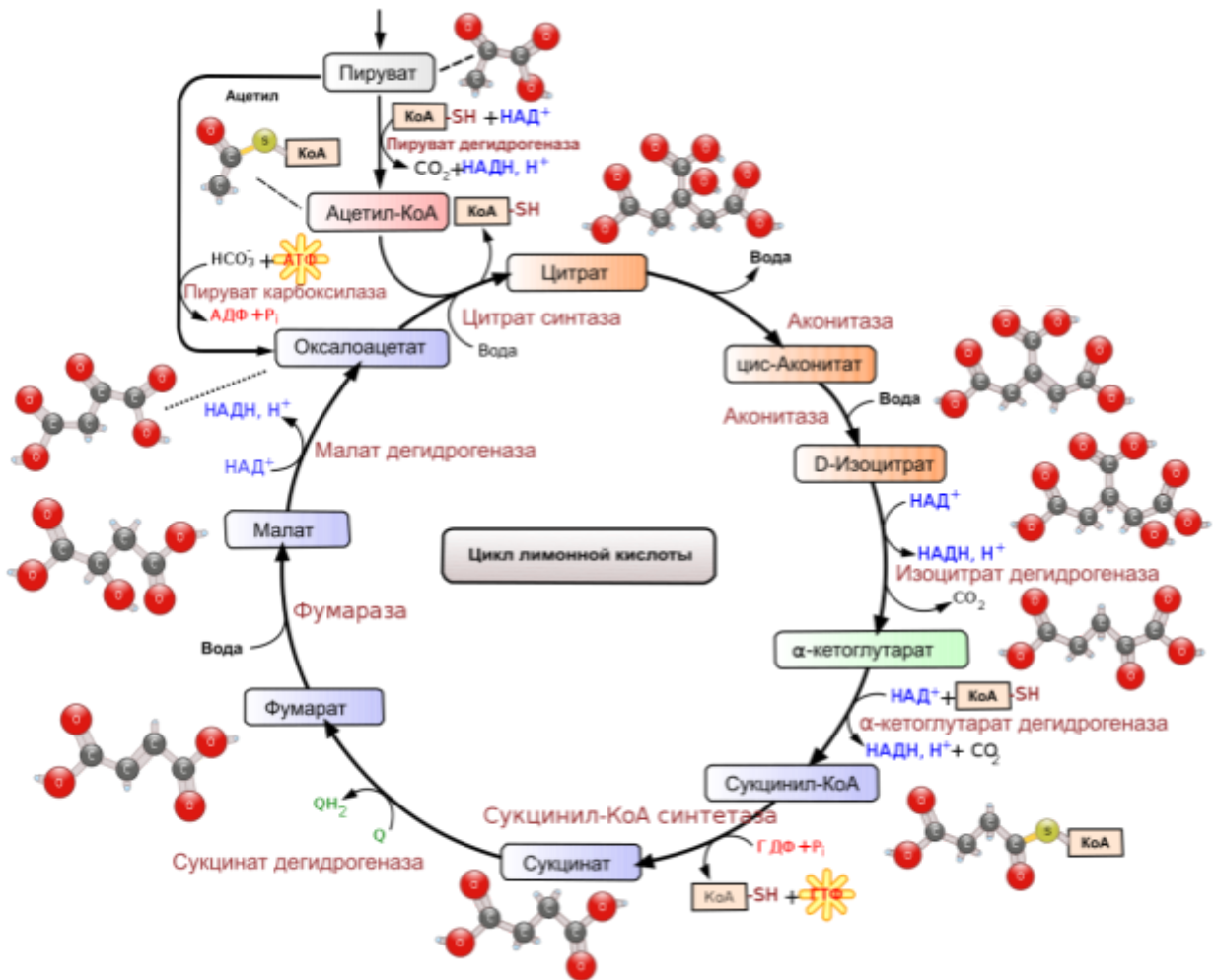


Рисунок 4. Цикл трикарбоновых кислот (цикл Кребса)

Цитратный цикл играет непосредственно центральную роль в промежуточном метаболизме клеток. Образующиеся восстановительные эквиваленты окисляются в дыхательной цепи (окислительное фосфорилирование) с образованием АТФ [25].

Так, как промежуточные продукты цитратного цикла присутствуют в

митохондриях лишь в очень незначительных количествах, то при окислении ацетил-КоА они вновь регенерируются, так что их концентрации остаются практически неизменными. Запас пула постоянно восполняется за счет метаболитов, поступающих из других источников.

### *Электрон-транспортная цепь*

Все элементы дыхательной цепи расположены в определенной последовательности и каждый следующий белок обладает наибольшим положительным окислительно – восстановительным потенциалом, чем предыдущий белок, что обеспечивает движение электронов только в одном направлении. Все атомы водорода, которые оторваны дегидрогеназами от субстратов в аэробных условиях, достигают внутренней мембраны митохондрий уже в виде НАДН или ФАДН<sub>2</sub>. Затем, атомы водорода передают свои электроны с ферментативную цепь, где они достигают своего конечного акцептора – кислорода, в результате чего образуется вода. Все поступающие в дыхательную цепь электроны по мере продвижения по цепи теряют свою потенциальную энергию. Поскольку перенос ионов водорода через мембрану происходит в определенных участках мембраны – эти участки называли «участки сопряжения» – так называемые пункты фосфорилирования.

Участки сопряжения представлены комплексами I, III и IV. Во время работы этих трех комплексов, формируется градиент («дельта мю») ионов водорода между наружной и внутренней мембранами. Такой электрохимический (протонный) градиент обладает потенциальной энергией [21]. Эти комплексы прокачивают протоны из матрикса в межбанное пространство. Комплекс II не прокачивает электроны, но способствует работе III и IV.

Прямое ингибирующее влияние электрохимического градиента на величину дыхания называется дыхательным контролем (АТФ/АДФ). Все реакции катаболизма основаны на поддержании постоянного высокого уровня АТФ и очень низкого АДФ. Прямое возрастание протонного градиента возникает непременно при снижении количества АДФ и напротив накопления АТФ, когда снижение

напротив возникает при истощении АТФ и избытке АДФ.

Следствием первого является уменьшение окисления НАД и ФАДН<sub>2</sub> на I и II комплексах, что приводит к замедлению катаболизма, а следствием второго как итог- увеличением катаболизма, т.к. при повышенном переносе ионов водорода ферментные комплексы I и II усиливают окисление НАД и ФАДН<sub>2</sub>.

Никотинамидные и флавиновые коферменты переносят электроны в электрон-транспортную цепь (ЭТЦ) или по-другому дыхательную цепь, находящуюся во внутренней мембране митохондрий. Эта цепь переносчиков электронов на кислород представлена четырьмя дыхательными комплексами:

I) НАДН-КоQ – оксидоредуктаза (НАДН-дегидрогеназа), содержащий в себе ФМН (флавинмоноклеотид), 42 белковых молекулы, из них не менее 6 железосерных белков, НАДН является поставщиком электронов в комплекс I, проходя через Redox centers комплекса (имеющие сродство с электронами) каждый последующий центр все больше имеет сродство с электронами, поэтому скачок электронов происходит последовательно— от верхнего центра к нижнему центру) последний центр передает два электрона на убихинон;

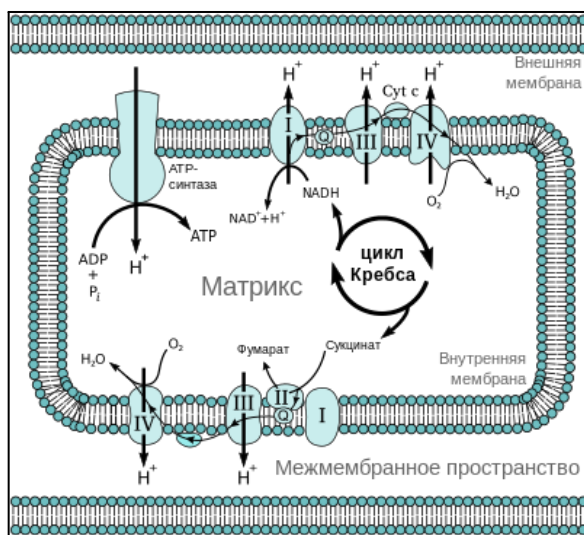


Рисунок 5. Окислительное фосфорилирование

II) ФАД-зависимые дегидрогеназы – (ацетил-SКоА, сукцинатдегидрогеназа и

глицерол-3-фосфат дегидрогеназа), подобно первому комплексу, электроны проходят через несколько Redox centers и последний центр передает два электрона на убихинон;

III) КоQ-цитохром с оксидоредуктаза (цитохрома b и цитохрома c<sub>1</sub>, железосерные белки), комплекс принимает электроны из комплекса I и II, электроны проходят через два Redox centers и перемещаются на цитохром-c, который в свою очередь переносит электроны на IV комплекс.

IV) цитохром с-оксидаза — в комплексе присутствуют ионы меди, соединенные с белками комплекса через HS-группы цистеина, с помощью четырех электронов превращают молекулу кислорода в две молекулы воды.

V) выделяют еще пятый комплекс: АТФ-синтаза «вращательный катализ», где для синтеза 1 молекулы АТФ необходимо прохождение через АТФ синтазу 3-ех протонов и еще один протон используется для транспорта P<sub>i</sub> в матрикс митохондрии и для импорта АДФ ↔ АТФ в цитозоль [21;25].

При отсутствии кислорода прекращается перенос электронов и синтез АТФ.

### ***Механизм вращательного катализа при синтезе АТФ***

Поток протонов через АТФ-синтазу напоминает турбину, которая вращается с помощью ветра или воды, в данном случае потоком протонов. Если поток протонов прекращается — белок останавливается, производство молекул АТФ прекращается. Без молекул АТФ клетка погибает в течении короткого времени. АТФ-синтаза состоит из двух компонентов: компонент F<sub>1</sub>, содержащийся в матриксе и компонент F<sub>0</sub>, который находится непосредственно в мембране. Протоны при достижении своих центров связывания из межмембранного пространства проходят через входной полуканал и прикрепляются к аспартату, воздействуя на его отрицательный заряд. Субъединица «с», которая лишена своего заряда вынужденно меняет свою конформацию и принуждает F<sub>0</sub>-компонент вращаться вокруг своей оси, доставляя протоны водорода к направленному каналу в матрикс митохондрий.



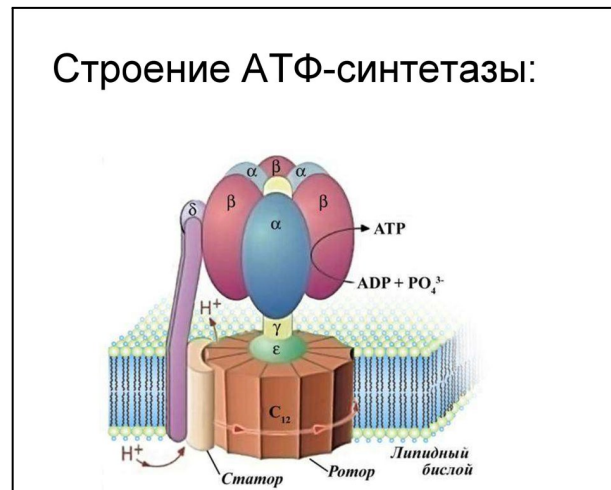


Рисунок 6. Строение АТФ-синтазы

Концентрация протонов водорода в матриксе очень низкая, они легко отрываются от аспартата и уходят внутрь, не позволяя комплексу вращаться в обратном направлении.

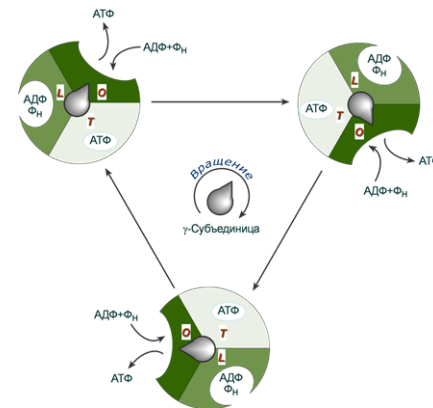
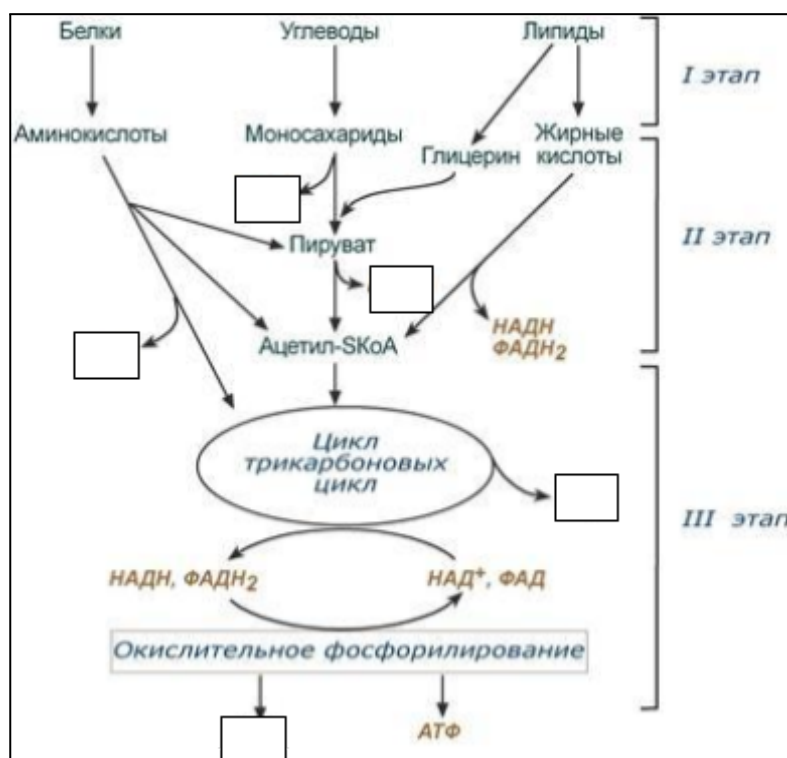


Рисунок 7. Вращение  $\gamma$ -субъединицы: loose, L– удерживает АДФ и ион фосфата; tight, T– "прижимает" молекулы АДФ и фосфат-иона, (синтез АТФ); open, O (англ. открыто) – в этом состоянии субъединица высвобождает АТФ и захватывает АДФ и ион фосфата

При связывании водорода происходит поворот с-субъединиц  $F_0$ -компонента вместе с связанной с ним  $\gamma$ -субъединицы  $F_1$ -компонента. При каждом повороте на  $120^\circ$  поочередно вступает в контакт с каталитическими  $\beta$ -субъединицами, что меняет их функционирование. При каждом обороте  $\gamma$ -субъединицы на  $360^\circ$  синтезируются три молекулы АТФ [21].

### Задание для актуализации знаний

1. Заполните схему:



### 2.3. Раздел «Клеточная гибель, апоптоз»

Очевидно то, что для нормального функционирования органов и тканей важен физиологический процесс, при котором старые, «больные» и нежизнеспособные клетки смогут покидать организм. Ежесекундно организм обновляется за счет избавления от «лишних» и образования новых клеток.

Момент зарождения теории клеточной гибели практически одновременно после принятия клеточной теории в 1838-1839 гг. В 1842 году Август Крис тоф Карл Фогт впервые описал принцип клеточной гибели, но намного позже в 1885 году анатом Вальтер Флемминг дал более точное описание клеточной гибели. До открытия запрограммированной клеточной гибели долго время считался клеточной гибелью некроз (некробиоз – терминология той эпохи). С течением развития технологического прогресса нашлось подтверждение тому, что некроз это не единственный вид клеточной гибели. Термин «апоптоз» был впервые употреблен в 1972 году в работе британских учёных — Дж. Керра, Э. Уайли и А. Керри. Дж. Керр путем частичного перевязывания портальной вены вызвал атрофию печени у крыс, наблюдая при этом последовательную гибель гепатоцитов (клетки паренхимы печени у человека и животных). В 2002 году была присуждена нобелевская премия по физиологии и медицине за исследования генетической регуляции апоптоза - запрограммированной гибели клеток трем молекулярным биологам: Сидней Бреннер, Джон Салстон и Роберт Хорвиц. В 2016 году нобелевская премия за изучение механизма аутофагии – процесса генетически контролируемого «переваривания» поврежденных частей клеток была присуждена Ёсинори Осуми (Yoshinori Ohsumi).

Апоптоз – запрограммированный физиологический процесс гибели клетки, в результате которой, клетка фрагментируется на отдельные части (фрагменты) ограниченные друг от друга плазмолеммой. Фрагменты носят название «апоптотические тельца», в будущем их ждет фагоцитоз макрофагами или соседними клетками [12].

На этапе эмбриогенеза наряду с развитием организма и образования новых клеток, этот этап также сопровождается образованием избыточного клеточного материала. Уничтожение этого материала происходит путем апоптоза (удаление перепонки между зачатками пальцев). Другими яркими примерами апоптоза служат разрушение эндометрия во время менструального цикла, гибель нейтрофилов при остром воспалительном ответе и лимфоцитов в конце

иммунного ответа. Причины гибели клеток разнообразны и весьма специфичны (поврежденная ДНК, накопление неправильно сложенных белков в ЭПР, вирусные инфекции).

Как и любой другой физиологический процесс клетками запускается и регулируется ферментами. Фермент отвечающий за активацию апоптоза клетки – каспазы, они относятся к классу ферментов протеаз (расщепляют пептидную связь —СО—NH— между аминокислотами в белках). Существует два класса каспаз: инициаторные отвечающие за начало апоптоза (каспазы-2,-8,-9,-10) и эффекторные (каспазы-3,-6,-7) ответственные за расщепление клеточных компонентов. Весь процесс апоптоза представляет собой каскад ферментативных реакций. Сначала один белок превращается в активный фермент, потом он становится субстратом для другого белка, и следующий белок также превращается в активный фермент и послужит субстратом для другого белка.

Следует знать, что у апоптоза есть два пути, внешний путь в процессе которого происходит связывании лиганда с рецептором смерти (TNF-R1, FAS (CD95), DR3, TRAIL-R1, TRAIL-R2 и др), находящимся на плазматической мембране различных клеток и внутренний путь, который зависит от митохондрий. Активация второго пути ведет к увеличению проницаемости наружной мембраны митохондрий, вследствие чего в цитоплазму выходят цитохром с (компонент электрон-транспортной цепи) и другие белки находящиеся в митохондриях, которые инициируют программу апоптоза.

На рисунке 8 видно, что ключевым белком запускающий процесс апоптоза является цитохром с. При попадании цитохрома с в цитоплазму клетки он присоединяется к фактору апоптотической протеазы 1 (Araf1) с образованием апоптосомы, которая в свою очередь активирует каспазы-9. Каспаза-9 действует как активатор каскада эффекторных каспаз, ведущие к запуску апоптоза.

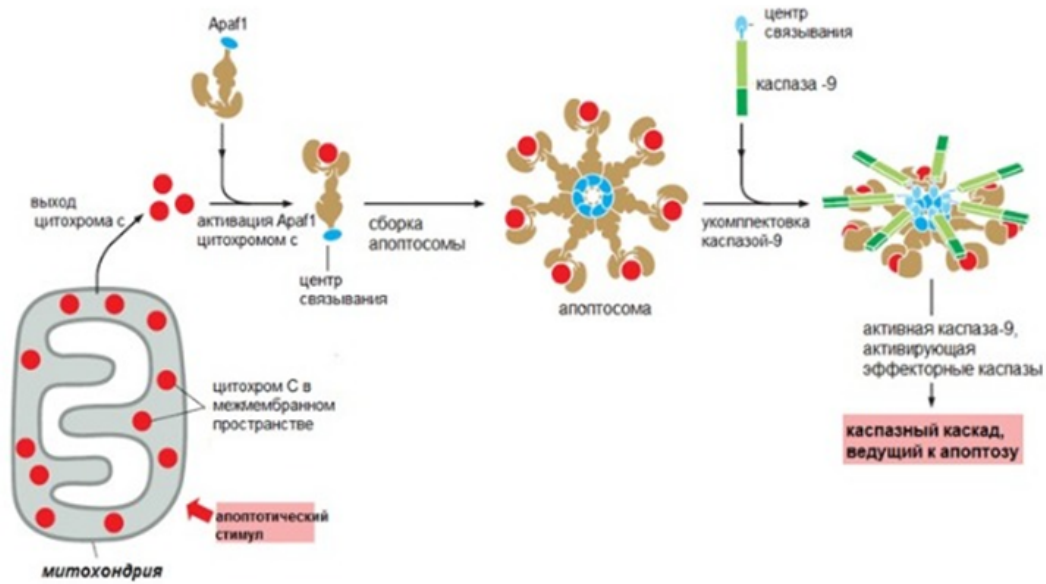


Рисунок 8. Внутренний путь апоптоза

За внутренний путь апоптоза отвечает три группы белков. Первая группа - проапоптотические, увеличивают выход митохондриальных белков и запуск апоптоза; вторая группа - антиапоптотические, подавляющие запуск апоптоза, блокируя выход митохондриальных белков; третья группа - содержит белки из первой группы и играют ключевую роль в регулировании и стимулировании апоптоза. Баланс между первой группой белков и второй группой определяет, выживет клетка или погибнет по внутреннему пути апоптоза [16; 27].

Как и говорилось ранее, апоптоз клетки заканчивается тем, что клетка фрагментируется на апоптотические тельца и изолируется плазмолеммой, тельца становятся целью для захвата и переваривания фагоцитами. Сигналом для узнавания фагоцитами служит фосфолипид, который содержится на наружной мембране – фосфатидилсерин. В нормальной здоровой клетке этот фосфолипид находится на внутренней стороне мембраны клетки, но в процессе апоптоза фосфатидилсерин выворачивается наружу.

Выделяют условно четыре стадии реализации апоптоза: инициация (получение сигналов), программирование (активация каспаз), реализация программы (образование апоптотических телец), удаление погибшей клетки

(фагоцитоз). Стадией апоптоза является процесс, при котором локально отделяется цитоскелет от материнской плазматической мембраны, захватывая с собой часть цитоплазмы—блеббинг. Блеббинг представляет собой «пузырьки», которые возникают на клеточной периферии. Образование пузырьков происходит отделения актомиозиновой коры (в основе плазматической мембраны), от двойного слоя фосфолипидов. Впоследствии, образовавшаяся полость полость заполняется цитоплазмой, остатками цитоскелета, митохондриями и т.д. образуя апоптотические тельца [27].

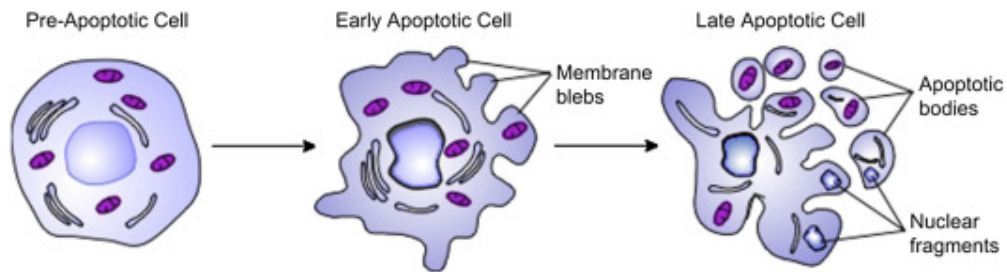


Рисунок 9. Процесс образования апоптотических телец и мембранного биббинга

На сегодняшний день, механизм апоптоза активно исследуется онкологами и другими специалистами, изучающие проблему злокачественных опухолей. Ведь по логике, при повреждении клеток должен запускаться механизм апоптоза, который избавит организм от «лишних» организму клеток. Но как оказалось, раковые клетки способны уклоняться от естественного физиологического процесса, пользуясь различными механизмами для подавления апоптоза. Клетки, которые по каким-либо причинам не поддались апоптозу, имеют название – дефекты апоптоза. Такие клетки способны выживать без прикрепления к внеклеточному матриксу, вызывая метастазы, устойчивые перед Т-клетками и натуральными киллерами.

***Задания для актуализации знаний***

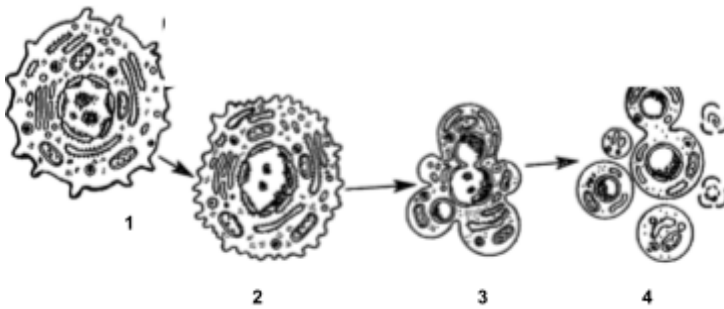
1. Вставьте пропущенные слова:

а) \_\_\_\_\_-запрограммированный физиологический процесс гибели клетки, в результате которой, клетка \_\_\_\_\_ на отдельные части (фрагменты) ограниченные друг от друга \_\_\_\_\_;

б) сигналом для узнавания \_\_\_\_\_ телец фагоцитами служит фосфолипид, содержащийся на \_\_\_\_\_ мембране – \_\_\_\_\_;

в) существует два класса каспаз: \_\_\_\_\_ отвечающие за начало апоптоза (каспазы-2,\_\_\_\_,-9,\_\_\_\_) и \_\_\_\_\_ (каспазы-3,\_\_\_\_,-7) ответственные за расщепление клеточных компонентов.

2. Что изображено на рисунке? Подпишите каждую стадию:



### Глава 3. Лабораторные занятия по физиологии клетки для школьников на базе Технопарка КГПУ им. В.П. Астафьева

Методика проведения развивающих занятий по физиологии клетки разработана по типу проведения лабораторных работ (занятий) и представляет собой совокупность правил, требований и специально разработанных методических приемов.

Лабораторная работа — распространенная форма организации учебного-воспитательного процесса, когда обучающиеся самостоятельно и под руководством учителя проводят опыты, включающие в себя измерения или элементарные исследования на основе разработанных заданий. Лабораторные занятия способствуют укреплению связи между теорией и практикой, обеспечивает единство между мыслительной и практической деятельностью. Наибольший педагогический эффект достигается при постановке проблемы, тогда лабораторное занятие приобретает исследовательский характер. Главным преимуществом лабораторного занятия исследовательского характера заключается в том, что на основе гипотезы учащиеся сами ищут подтверждение или опровержение с помощью технических средств и доступных материалов [15].

Дидактические цели лабораторных занятий:

- овладение техникой эксперимента;
- формирование умений решать практические задачи путем постановки опыта;
- экспериментальное подтверждение теоретических положений в процессе эксперимента.

Дидактические задачи лабораторных работ:

- формирование умений применять полученные теоретические знания на практике, реализацию единства интеллектуальной и практической деятельности;
- развитие интеллектуальных умений у учащихся: аналитических,



проектировочных, и т.д.;

- формирование значимых качеств, как самостоятельность, ответственность, точность, творческая инициатива.

В структуре проведения лабораторной работы занятия необходимо выделить:

### 1. Вводная часть

- организационный момент;
- мотивация учебной деятельности;
- сообщение темы, постановка целей;
- повторение теоретических знаний, необходимых для работы с оборудованием;
- инструктаж по технике безопасности;
- выдача задания;
- определение алгоритма проведения эксперимента или другой практической деятельности;
- ознакомление со способами фиксации полученных результатов;

### 2. Самостоятельная работа

- определение путей решения поставленной задачи;
- выработка последовательности выполнения необходимых действий;
- проведение эксперимента (выполнение заданий, задач, упражнений);
- составление отчета, оформление работы;
- подведение итогов, проведение выводов.

### 3. Заключительная часть

- рефлексия (подведение итогов занятия: анализ хода выполнения и результатов работы обучающихся, выявление возможных ошибок и определение причин их возникновения).

Этапы занятий могут отличаться от предложенных и носят исключительно рекомендательный характер.

К развивающей части занятия будут относиться аспекты направленные на достижение таких результатов как: развитие мыслительной деятельности, развитие мелкой моторики при приготовление микропрепаратов, развитие и углубление ранее полученных знаний, развитие речевых способностей (умение говорить связно, отвечать на конкретно поставленные вопросы, слушать других и дополнять ответы), развитие творческих способностей при оформлении лабораторных работы (зарисовка микропрепаратов, красивое оформление работы), развитие коммуникативных действий (работа в паре, работа в группе, работа с преподавателем или ассистентом), при работе с лабораторным оборудованием (техническое обеспечение) развиваются у школьников навыки по работе с современным техническим оборудованием

#### Лабораторное занятие №1

##### *«Микроскопическое исследование дрожжей»*

На сегодняшней день микроскоп является самым распространенным и востребованным прибором для изучения в области медицины, биоинженерии, фармакологии, криминалистике, металлоскопии и т.д.. Условно можно считать, что история физиология клетки началась с открытием в мире первого микроскопа. Микроскоп (греч.  $\mu\kappa\rho\sigma$  – мелкий, маленький и  $\sigma\kappa\omicron\pi\acute{\epsilon}\omega$  – вижу) оптический прибор, предназначенный для получения увеличенного изображения наимельчайших объектов, структуры объекта, невидимых или плохо различимых невооруженным глазом [10].

В 1943 году впервые была описана фазово контрастная микроскопия голландским физиком Фрицем Цернике, который стал лауреатом Нобелевской премии по физике в 1953 году за изобретение фазово-контрастного микроскопа и обоснование фазово-контрастного метода получения изображений в оптических микроскопах. Такой метод используется для получения изображений прозрачных объектов. Фазово-контрастные микроскопы пользовались и пользуются большим спросом для проведения биологических и медицинских исследований. Ведущим

обоснованием такого метода является то, что живую клетку не требуется окрашивать или фиксировать для проведения исследования, что сохраняло жизнь клетке и облегчало проведение длительных исследований [30].

Принцип работы фазово-контрастного микроскопа работает следующим образом: пучок света проходящий через микропрепараты, рассеивается на два пучка— преломленный луч света (переходя из одной среды в другую, изменяет направление на границе этих сред) и непреломленный луч света. в этот момент фазовая пластина ослабляет непреломленный луч света, что дает возможность для снижения его интенсивности, а преломленный луч света и вовсе не попадает на пластину. Таким образом, картинка формируется благодаря изменениям в фазе в плоскости изображения.

Благодаря этому невидимые, неконтрастные микроорганизмы, незаметные при обычном наблюдении в световой микроскоп, становятся высококонтрастными, и прекрасно визуализируются. Они могут наблюдаться темными на фоне светлого цвета, так называемый, позитивный фазовый контраст, а также, наоборот, негативный контраст, когда исследуемый объект выглядит светлым на темном фоне.

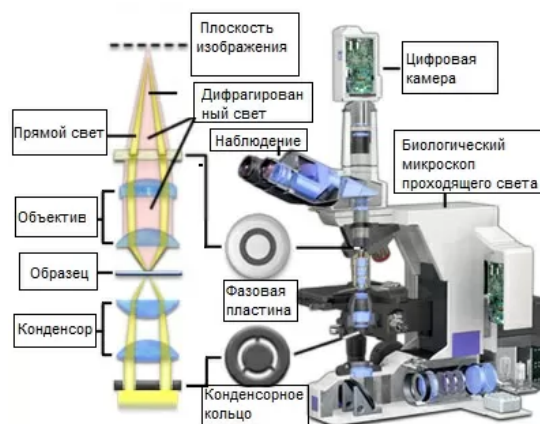


Рисунок 10. Схема строения фазово-контрастного микроскопа в разрезе

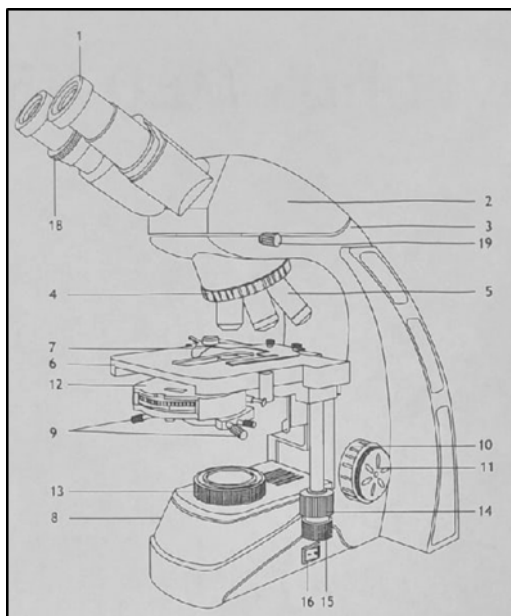


Рисунок 11. Устройство микроскопа Levenhuk MED D45T: 1-окуляры с 10-кратным увеличением, 2-би/тринокулярная насадка, 3-опорная стойка, 4-револьверное устройство, 5-объектив, 6-предметный столик, 7-препаратоводитель, 8-регулятор яркости подсветки, 9-юстировочные винты, 10-ручка грубой фокусировки, 11-ручка тонкой фокусировки, 12- фазовый конденсор, 13- коллектор, перемещение столика по горизонтали -14, по вертикали -15, кнопка вкл/выкл подсветки, 17-переключатель(делитель светового поля), 18-кольцо диоптрийной настройки.

Для изучения в области физиологии моделью эукариотических клеток выступает дрожжевая клетка. Дрожжи применяют практически во всех сферах деятельности человека, начиная от производства вин и хлебобулочных изделий до фармакологии и ликвидации экологических катастроф (загрязнение почвы и воды нефтяными продуктами). Дрожжевую клетку впервые открыл Антони ван Левенгук, капнув бражку на предметное стекло, он рассмотрел под микроскопом мельчайшие частицы, которые бодро двигались, и дал им название «анималькули». В своих мемуарах он подробно описал их строение, что

соответствует современным представлениям о дрожжах.

Дрожжи *Saccharomyces* активно используют в биотехнологии. С помощью дрожжей производят технический этанол в больших количествах, витамины, полисахариды, липиды, ферменты, применяемые в пищевой промышленности, продукты, молочная кислота [4].

Перспективным направлением считается получение ферментов из дрожжей: пектиназ, амилаз и других ферментов из разных культур дрожжей.

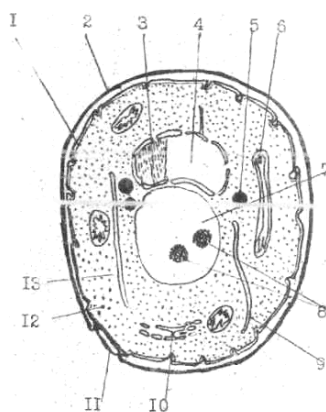


Рисунок 12. Строение дрожжевой клетки: 1 - цитоплазматическая мембрана; 2 - клеточная стенка; 3 - ядрышко; 4 - ядро; 5 - жировые капли; 6 - митохондрии; 7 - вакуоль; 8 - гранулы полифосфата; 9 - эндоплазматическая сеть; 10 - аппарат Гольджи; 11 - почковый рубец; 12 - рибосомы; 13 – цитоплазма

Цель: познакомиться с методом микроскопического исследования с использованием фазово-контрастного микроскопа, произвести наблюдение за клетками дрожжей.

*Оборудование и материалы:* покровные стекла, предметные стекла, стерильные пипетки, дистиллированная вода, стакан на 100 мл и пробирка, сахар, фильтровальная бумага, термометр лабораторный, микроскоп, сухие дрожжи хлебопекарные.

#### *Ход работы*

1. Правила работы в лаборатории. Работать в лаборатории необходимо в халате. Запрещается что-либо пробовать на вкус. Волосы должны быть убраны. В

лаборатории следует вести себя аккуратно, соблюдать спокойный режим шага, размахивать руками, отвлекать коллег и громко кричать запрещается. На лабораторном столе во время работы не должно быть посторонних предметов. Выполнять работы следует аккуратно. В лаборатории строго запрещается проносить или принимать пищу и напитки. Если работа предполагает использование едких или сильно пахнущих веществ - следует использовать защитные очки и перчатки.

2. Правила работы с микроскопом. Перед приготовлением микропрепарата нужно подготовить микроскоп к работе. Для начала ознакомьтесь с устройством микроскопа.

1) включите подсветку микроскопа, переведите объектив на самое малое увеличение, опустите предметный столик, если он сильно поднят. Попробуйте подвигать предметный столик с помощью винтов;

2) при просмотре микропрепарата на самом большем увеличении используйте иммерсионное: переведите объектив 100-кратного увеличения в положение буквы «Л» по отношению к предметному столику, поднимите предметный столик так, чтобы между объективом и покровным стеклом было примерно 1-2 мм; капните каплю иммерсионного масла на покровное стекло и переведите объектив в нормальное положение; масло должно плотно соприкоснуться с линзой так, что при передвижении предметного стекла капля не отрывалась от покровного стекла и линзы объектива.

При необходимости повторите операцию до достижения наилучшего результата.

3. Приготовление живых препаратов микроорганизмов. Для начала следует приготовить суспензию клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (дрожжи хлебопекарные). Для этого следует взять пробирку, в пробирку поместить 0,5-1 г сухих дрожжей, 0,2 г сахара (в одной чайной ложке 5 грамм сахара без горки) прилить чистой дистиллированной воды примерно 3 мл и перемешать стеклянной палочкой. В чистый стакан налить теплой воды примерно 30-33 °С, опустить в

него пробирку с дрожжами, выдержать 10-15 минут. Появление пузырьков или пены свидетельствует о активном дыхании дрожжей. В центр предметного стекла пипеткой нанести каплю суспензии дрожжей. Если капля густая, то нужно предварительно разбавить ее дистиллированной водой. Покровное стекло ставят на ребро у края капли и постепенно опускают на нее таким образом, чтобы между стеклами не оставалось пузырьков воздуха. Излишки жидкости выступающей за края покровного стекла следует убрать фильтровальной бумагой.

а) Рассмотрите на самом малом увеличении, (но следует учитывать, что окуляры имеют увеличение 10 крат, поэтому каждый объектив умножаем на 10), постепенно переходя на самое большое увеличение.

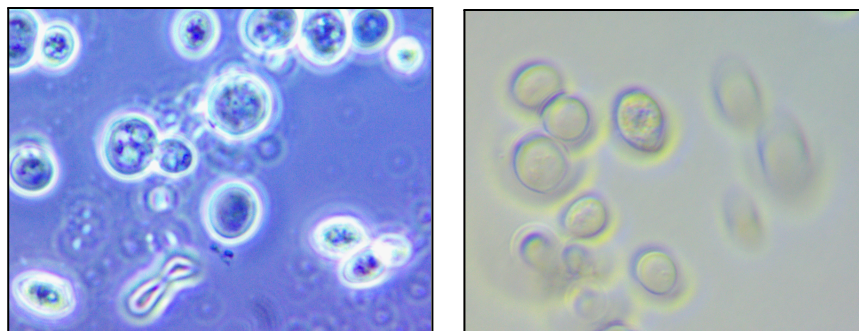


Рисунок 13. Изображение дрожжей под микроскопом: слева изображение в фазово-контрастном конденсоре, справа обычный световой конденсор

Рассмотрите формы клеток, отметьте, в каком состоянии они находятся:

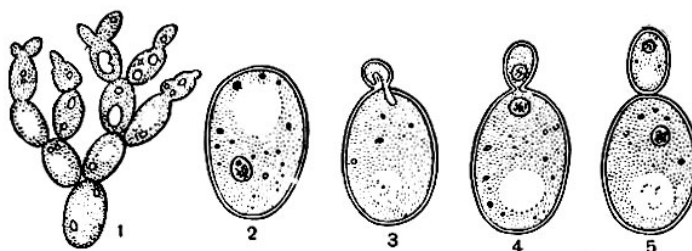


Рисунок 14. *Saccharomyces cerevisiae* 1 - цепочка почкующихся дрожжей, 2 -

отдельная клетка, 3, 4, 5 - почкующиеся клетки

б) Рассмотрите этот же препарат на обычном световом конденсоре. Сделайте вывод по отношению качества изображения и видимых органелл.

4. Зарисуйте полученные результаты. Сделайте выводы. Оформите работу.

5. Вопросы для обсуждения:

1) Как вы думаете, в чем заключается главное преимущество фазово-контрастного микроскопа перед обычным световым?

2) Чем обусловлено появление пузырьков газа в пробирке?

3) Если развести дрожжи в холодной воде, будем ли мы наблюдать похожий эффект?

4) Какая среда для дрожжей является питательной, почему именно сахара является благоприятной средой для дрожжей? Будет ли такой же эффект при использовании соляного раствора?

5) Какие видимые процессы вам удалось увидеть?

*Примерный вывод: сегодня на занятии мы познакомились с методом микроскопического исследования с помощью фазово-контрастного микроскопа, при наблюдении за дрожжевыми клетками мы увидели ядро с ядрышком, большую вакуоль, клеточную мембрану, движение цитоплазмы, образование почкового рубца и начало образования почки.*

## Лабораторное занятие №2

*«Реакция эритроцитов на изменение осмотических условий во внеклеточной жидкости.»*

Осмоз – коллигативное свойство живых систем (свойства растворов, зависящие от концентрации других веществ), при котором осуществляется движение воды вдоль ее градиента концентрации [19]. Впервые диффузию жидкостей и осмос обнаружил и описал Жан-Антуан Нолле в 1748 году на примерке стенки мочевого пузыря животного.



На примере осмотического давления на эритроциты происходит разрушение мембраны эритроцитов с выходом гемоглобина в плазму крови, такой процесс носит название — гемолиз. Чем старше клетки эритроцитов, тем менее устойчива к гемолизу клеточная стенка эритроцитов. Эритроциты не имеют ядра и других органелл, которые обеспечивают регенерацию клеточной стенки и возвращению к исходной форме.

Благодаря осмосу поддерживается форма любых клеток, эластичность, упругость клеток и рост клеток. Клетка всегда стремится к тому, чтобы концентрация веществ по обеим сторонам мембраны клетки всегда была одинаковой [3; 19].

Цель: исследовать реакцию эритроцитов на изменение концентрации соли внеклеточной жидкости, продолжить формировать навыки микроскопического исследования.

*Оборудование и реактивы:* предметные стекла, покровные стекла, пипетка стерильная, микроскоп, пробирки, штатив для пробирок, дистиллированная вода, соль поваренная, физраствор (NaCl 0,9%), свежий препарат крови, фильтровальная бумага.

#### *Ход работы*

1. Актуализация знаний по ТБ (см. лабораторную работу №1).
2. Приготовление микропрепаратов. Приготовьте гипертонический раствор, изотонический раствор и гипотонический раствор.
  - а) Изотонический раствор представляет собой физраствор (NaCl 0,9%), гипотонический раствор - дистиллированная вода, гипертонический раствор приготавливается из расчета на 100 мл дистиллированной воды 5 г поваренной соли.
  - б) На предметное стекло капнуть с помощью стерильной пипетки 1 каплю крови и 1 каплю изотонический раствор, рассмотреть сначала на малом увеличении, за тем перейти на большее увеличение. Отметить видимые явления.

Те же самые действия проделать с гипертоническим раствором и гипотоническим раствором.

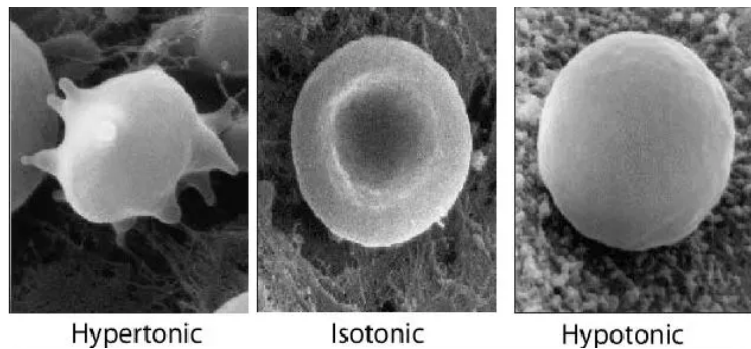


Рисунок 15. Реакция эритроцитов на изменение осмотических условий  
внутриклеточной жидкости

3. Зарисуйте результаты, запишите видимые изменения, оформите лабораторную работу, сделайте выводы.

4. Вопросы для обсуждения:

1. Дайте определение явлению «гемолиз»?
2. Каковы причины физиологического гемолиза?
3. Почему при использовании изотонического раствора в медицинских инъекциях мы не ощущаем попадания его в кровь?

*Примерный вывод: на лабораторном занятии мы познакомились с гемолизом эритроцитов, рассмотрели микропрепараты с добавлением гипертонического раствора (эритроциты сжимались в форму ежика), с добавлением изотонического раствора (ничего не происходило), и с добавлением гипотонического раствора (клетки лопались).*

Лабораторное занятие было апробировано с инициативной группой старшей ступени обучающихся из МБОУ СШ № 62.

## Лабораторное занятие №3

## «Определение интенсивности дыхания суспензии дрожжей»

Методы исследования подразделяются на *прямые* и *непрямые*, а технические устройства могут быть *открытыми* и *замкнутыми*.

*Современные методы количественной оценки интенсивности дыхания клетки* —метод полярографического анализа энергетической активности клетки (в основном митохондрий). Интенсивность энергетического обмена оценивается по скорости потребления кислорода суспензией клеток или фрагментов ткани в полярографической ячейке. Показания регистрируют с помощью электрода Кларка, состоящего из платинового катода и хлорсеребряного анода, погруженных в насыщенный раствор KCl.

На катоде происходит восстановление  $O_2$  до  $O^-$ . Ионы  $OH^-$  диффундируют к аноду и образуют с серебром оксид  $Ag_2O$ :



Возникающее напряжение прямо пропорционально концентрации кислорода в среде [11].

Цель: актуализировать знания о клеточном энергетическом обмене, определить интенсивность дыхания суспензией дрожжей с помощью полярографического метода анализа.

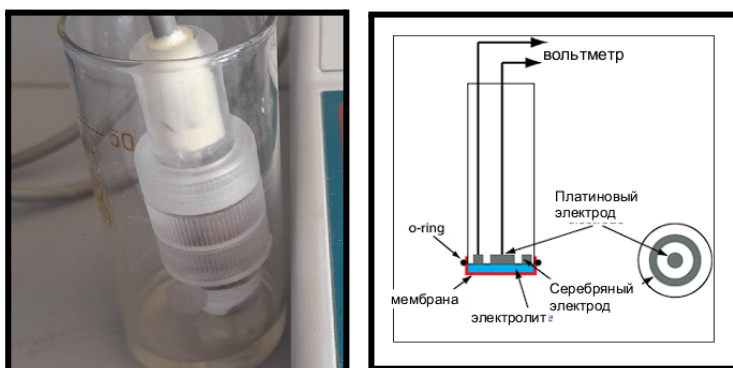


Рисунок 16. Схема устройства электрода Кларка

*Оборудование и материалы:* датчик Кларка, термостатируемая ячейка из оргстекла для клеточных суспензий; магнитная мешалка; инометр Эксперт-001; компьютер с программным обеспечением, весы, дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, раствор сахарозы, термометр, стаканы, пробирки, стерильные пипетки, калибровочный раствор 5% раствор сульфита натрия.

#### *Ход работы*

1. Актуализация знаний по ТБ (см. лабораторную работу №1);
2. Приготовление суспензии дрожжей. Взвесить 10 мг дрожжей, в слегка подогретый раствор сахарозы 30-33°C добавить дрожжи. Выдержать 20-30 минут.
3. Сбор установки. Сбор установки следует проводить аккуратно, строго с заданной последовательностью как на рисунке 16:

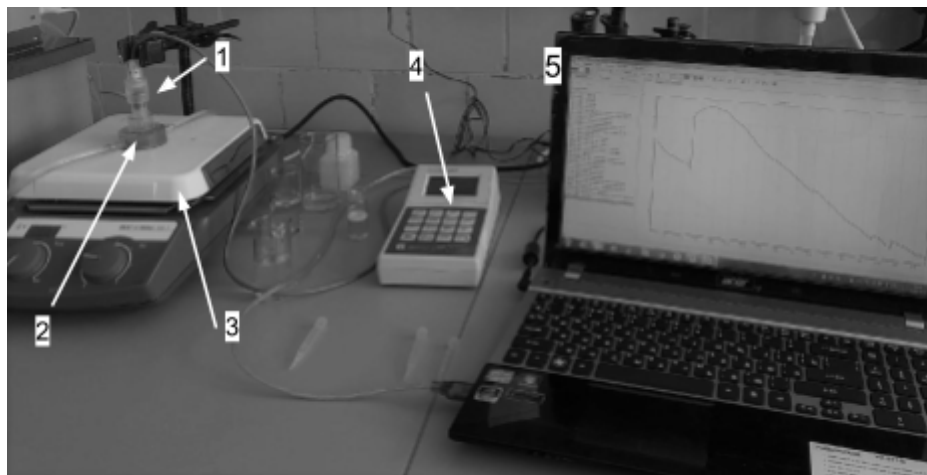


Рисунок 16. Установка для полярографического определения интенсивности дыхания клеток: 1—датчик Кларка, 2—термостатируемая ячейка из оргстекла для клеточных суспензий; 3—магнитная мешалка; 4— инометр Эксперт-001; 5—компьютер с программным обеспечением

4. Перед началом эксперимента следует провести калибровку. В ячейку для клеток внести дистиллированную воду и смешать ее с помощью магнитной мешалки в течение 15 мин. При этом достигается 100% насыщение воды  $O_2$  в

ячейке, которому соответствует значение тока 21 мкА на дисплее иономера. Затем добавить в ячейку 5% раствор сульфита Na, в нем отсутствует кислород. Значение тока на дисплее прибора падает до наименьших значений — 3 мкА, соответствующих отсутствию кислорода.

5. Регистрация скорости потребления кислорода суспензией дрожжей. Ячейку тщательно промыть, с помощью автоматической пипетки залить 1,4 мл биологического буфера pH 7,4 (буфер — Кребс-Рингер фосфатный буфер pH 7,4, насыщение кислорода 100%, что соответствует 263 нмоль O<sub>2</sub>). Затем добавить 0,1 мл суспензии дрожжей. Изменение концентрации кислорода в ячейке удобно регистрировать с помощью программного обеспечения к аппарату Эксперт – 001, отображаемому на дисплее компьютера в виде таблицы данных или графически в виде зависимости тока (мкА) от времени. Динамика изменения концентрации кислорода в ячейке представляет практически линейную зависимость от времени.

6. Расчеты скорости потребления кислорода суспензией дрожжей.

$$(21 - 3) \text{ мкА} - 263 \text{ нмоль}$$

$$0,024 \text{ мкА/мин} \cdot \text{мг} - X$$

$$X = 0,35 \text{ нмоль O}_2/\text{мин}$$

7. Анализ влияния на дыхание дрожжей метаболического ингибитора — нитрита натрия NaNO<sub>2</sub>. Подготовить все для регистрации дыхания дрожжей как описано в пункте 5. Через 1,5 мин после начала регистрации добавить 2 мкл 0,028 мМ раствора нитрита натрия. Пронаблюдать угнетение дыхания, сделать расчеты дыхания в присутствии NaNO<sub>2</sub> (как описано в пункте 6).

8. Оформление результатов:

Таблица 1

Влияние нитрита натрия на скорость дыхания *Saccharomyces cerevisiae*

Биообъект	Показатели
<i>Sacharomyces cerevisiae</i> в питательной среде	0,35 нмоль/мин мг
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0,015 нмоль/мин мг

<i>в нитрате натрия</i>	
-------------------------	--

5. Вопросы для обсуждения:

1. Придумайте тему исследовательской работы на основе этого метода?
2. Посмотрите на рисунок 17, и подумайте: почему при добавлении ADP интенсивность дыхания увеличилась, а при добавлении KCN, наоборот, скорость потребления кислорода упала? В чем особенность ADP

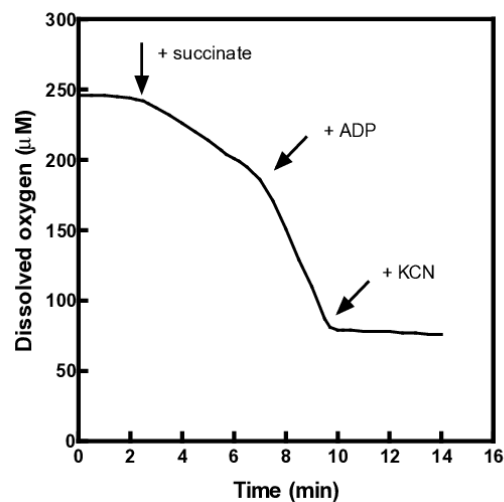


Рисунок 17. Временная динамика скорости потребления кислорода митохондриями

*Примерный вывод: во время лабораторной работы мы зарегистрировали и рассчитали скорость дыхания клеток дрожжей, которое косвенно отражает интенсивность энергетического обмена. При добавлении метаболитического яда нитрита натрия скорость потребления кислорода резко упала, это свидетельствует о блокировании электрон-транспортной цепи. Этот метод можно использовать при изучении механизмов работы электрон-транспортной цепи, а также при экологическом мониторинге.*

## ВЫВОДЫ

1. Лаборатория генетики и биотехнологий технопарка КГПУ им. В.П. Астафьева располагает современными оптическими микроскопами, включая фазово-контрастный микроскоп Levenhuk MED D45T, полярографической установкой для проведения развивающих занятий по физиологии клетки. Это оборудование позволяет проводить лабораторные работы по наблюдению морфологии живых клеток в процессе роста, дифференцировки, внешних воздействий на культуру, регистрации клеточного дыхания.

2. Для проведения развивающих занятий выбраны разделы физиологии клетки («Транспорт веществ через мембрану», «Энергообмен, клеточное дыхание, дыхательный контроль», «Клеточная гибель, апоптоз»), которые соответствуют материально-техническому оснащению лаборатории и интересам школьников старшей ступени обучения. Теоретические материалы к занятиям адаптированы из современных вузовских учебных пособий, из научно-популярной и научной литературы по молекулярной биологии и физиологии клетки. К каждому занятию разработаны задания для самоконтроля и актуализации знаний.

3. Мини-практикум для проведения лабораторных развивающих занятий составлен от простого к сложному и может использоваться при проведении занятий у обучающихся разных возрастов как при базовом, так и при профильном обучении. Мини-практикум включает три лабораторных работы («Микроскопическое исследование дрожжей», «Реакция эритроцитов на изменение осмотических условий во внеклеточной жидкости.», «Определение интенсивности дыхания суспензии дрожжей»), имеет значительный потенциал для проведения научно-исследовательских работ и для формирования междисциплинарных связей с химией, физикой, с экологией, фундаментальной медициной. Методические рекомендации к проведению занятий соответствуют требованиям ФГОС и содержит в себе все структурные элементы необходимые для лабораторного занятия.

**Библиографический список**

1. Абрамова З.И. Теория апоптоза, аутофагии и некроза: Учебно-методический комплекс. К.:Казанский (Приволжский) федеральный университет, 2011. 77 с.
2. Агаджанян Н.А., Смирнов В.М. Нормальная физиология: Учебник для медицинских вузов. М.: ООО «Изд-во Медицинское информационное агенство, 2009. С. 352-369
3. Альбертс Б., Альбертс, Д. Брей, К. Хопкин, А. Джонсон, Дж. Льюис, М. Рэфф, К. Робертс, П. Уолтер. Основы молекулярной биологии клетки. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2015.
4. Банницына Т.Е., Канарский А.В., Щербаков А.В., Чеботарь В.К., Кипрушкина Е.И. Дрожжи в современной биотехнологии // Вестник МАХ, 2016. №1.
5. Беркинблит М.Б., Глаголев С. М., Фуралев В. А.. Общая биология. М.: МИРОС, 1999. 224 с.
6. Березов Т. Т., Коровкин Б. Ф. Биологическая химия: Учебник. 3-е изд., перераб. доп.М.: Медицина, 1998. 704 с.
7. Биохимия. Версия 1.0 [Электронный ресурс]: электрон. учеб. пособие / Т. Н. Замай, Н. М. Титова, Е. И. Елсукова, А. В. Еремеев. Красноярск: ИПК СФУ, 2008.
8. В педагогических вузах появятся межфакультетские технопарки Минпросвещения России [Электронный ресурс]. URL <https://edu.gov.ru/press/3817/v-pedagogicheskikh-vuzah-poyavyatsya-mezhfakultetskie-tehnoparki/> (дата обращения 22.03.2022)
9. Вешкин Н.Л. Биофизика митохондрий. М.: ООО «Фотон-век», Пушкино, 2019, 264 с.
10. Виноградова Г.Н. История науки и приборостроения: учебное пособие. СПб: НИУ ИТМО, 2012. 161 с. [Электронный ресурс] URL:[http://www.techlibrary.ru/b/2j1j1o1p1d1r1a1e1p1c1a\\_2k.2v.\\_2q1s1t1p1r1j2g\\_](http://www.techlibrary.ru/b/2j1j1o1p1d1r1a1e1p1c1a_2k.2v._2q1s1t1p1r1j2g_)



- 101a1u11j\_1j\_1q1r1j1b1p1r1p1s1t1r1p1f1o1j2g\_2012.pdf (дата обращения 12.01.22)
11. Грабельных О. И. Методы изучения митохондрий растений. Полярография и электрофорез. М.: НПК Промэкобезопасность, 2004. 98 с.
  12. Деев Р. В., Билялов А. И., Жампеисов Т. М. Современные представления о клеточной гибели // Гены и клетки. 2018. Т. 13. №. 1. С. 6-19.
  13. Зинчук В.В. [и др.] Практикум по нормальной физиологии : учебное пособие в 2-х ч.. Гродно: ГрГМУ, 2013. Ч. II. 259 с.
  14. Клетка - единица физиологических процессов обмена МедУнивер [Электронный ресурс] URL <https://meduniver.com> (дата обращения 05.03.2022)
  15. Лабораторные работы или лабораторные занятия в общеобразовательной школе Педагогическая энциклопедия [Электронный ресурс] URL <http://pedagogic.ru/> (дата обращения 26.04.2022)
  16. Лозовская Е. Нобелевские премии 2002 года: Запрограммированная смерть-необходимое условие жизни // Наука и жизнь. 2002. №. 12. С. 22. [Электронный ресурс] UR <https://www.nkj.ru> (дата обращения 04.03.2022)
  17. Нельсон Д. Основы биохимии Ленинджера: в 3 т. Т. 2. Биоэнергетика и метаболизм / Нельсон Д., Кокс М.; пер. с англ. 2-е изд. М.: БИНОМ Лаборатория знаний, 2015. 693 с.
  18. Нобелевскую премию по физиологии и медицине дали за исследование аутофагии ФГБУ "НМИЦ радиологии" Минздрава России [Электронный ресурс] URL <https://uroline.nmicr.ru/news/otrasli/nobelevskuyu-premiyu-po-fiziologii-i-meditsine-dali-za-issledovanie-autofagii/> (дата обращения 04.03.2022)
  19. Осмос Studfile [Электронный ресурс] URL <https://studfile.net> (дата обращения 10.03.2022)
  20. Приказ от 04 апреля 2022 года № 153 (п) об утверждении Положения о Технопарке универсальных педагогических компетенций КГПУ им.В.П.Астафьева (КГПУ им. В.П. Астафьева) [Электронный ресурс] URL <http://www.kspu.ru/upload/documents/2022/05/26/83b28fd447ec5c811cbb3c3ff117>

2b81/polozhenie-o-tehnoparke-universalnyih-pedagogicheskikh-kompetentsij-utv-prikazom-.pdf

21. Северин Е.С., Алейникова Т.Л., Осипов Е.В., Силаева С.А. Биологическая химия. М.: ООО Медицинское информационное агентство, 2008. 364 с.
22. Соболев С.А. История микроскопа и микроскопических исследований в России в XVIII веке. М.: Академия Наук, 1949. 605 с.
23. Уайт А., Хендлер Ф., Смит Э., Хилл Р., Леман И. Основы биохимии: В 3 т. Т. 1. Пер. с англ. / Скулачева В.П., Гиномана Л.М., Марченко Т.В.; Под ред. и с предисл. Ю.А.Овчинникова. М.: Мир, 1981. 534 с.
24. Федеральный проект Современная школа Минпросвещения России [Электронный ресурс] URL <https://edu.gov.ru/national-project/projects/school/> (дата обращения 22.03.2022)
25. Элиот В., Элиот Д. Биохимия и молекулярная биология. М.: МАИК Наука/Интерпериодика, 2002. 446 с.
26. Ягафарова Г.Г., Гатауллина Э.М., Мавлютов М.Р., Спивак А.И., Абызгильдина М.Ю. Способ очистки воды и почвы от нефтепродуктов // Российский патент 1997, RU2093478C1 [Электронный ресурс] URL <https://patenton.ru/> (дата обращения 22.03.22)
27. Blebbing ScienceDirect [Электронный ресурс] URL <https://www.sciencedirect.com/> (дата обращения 10.03.2022)
28. Heyrovský J. The Trends of Polarography // Review of Polarography. 1960. V. 8. №. 3. P. 85-95.
29. Stillwell W. Membrane transport // An Introduction to Biological Membranes (Second Edition). - Elsevier. 2016. P. 423-451
30. Zernike F. Nobel Lectures, Physics 1953, How I discovered phase contrast, December 11, 1953 // Nobel Lectures. 1995. №. 2.