

## ❖ Φυσικές μέθοδοι μελέτης βιολογικών φαινομένων

### ➡ Υπερφυγοκέντρωση

- Η υπερφυγοκέντρωση χρησιμοποιείται πλατιά για το *διαχωρισμό ή την μελέτη μακρομορίων*, συμβάλλοντας κύρια στη γνώση της μορφής και του μοριακού βάρους βιοπολυμερών, όπως π.χ. οι πρωτεΐνες, τα νουκλεϊνικά οξέα κ.λ.π.
- Στην υπερφυγόκεντρο οι ουσίες κινούνται με τον ίδιο τρόπο που κινούνται σε πεδίο βαρύτητας, με τη διαφορά ότι η φυγόκεντρος δύναμη υπερτερεί κατά πολύ της βαρύτητας. Με τη φυγοκέντρωση επιτυγχάνεται η επιλεκτική *καθίζηση* μακρομορίων σε διάλυμα ή κυτταρικό ελαιώρημα.
- Αν ένα μόριο περιστρέφεται με γωνιακή ταχύτητα  $\omega$  (rad/s) θεωρούμε ότι υφίσταται μια φυγόκεντρο δύναμη μέτρου  $F_c = m\omega^2 r$ , όπου  $m$  η μάζα του μορίου και  $r$  η απόσταση του από το κέντρο περιστροφής. Το μόριο εκτοπίζει κάποια μάζα διαλύματος, ασκώντας μια δύναμη μέτρου  $F_a = -m_0\omega^2 r$ , όπου  $m_0$  η μάζα του εκτοπιζόμενου διαλύματος. Επιπλέον υπάρχει η δύναμη τριβής, με μέτρο  $F_f = fu$ , όπου  $f$  ο συντελεστής τριβής και  $u$  το μέτρο της ταχύτητας που αποκτά το μόριο. Αν θεωρήσουμε ένα μόριο σφαιρικής μορφής με ακτίνα  $r_0$ , το οποίο βρίσκεται σε διάλυμα του οποίου ο συντελεστής ιξώδους είναι  $\eta$ , τότε η δύναμη τριβής (δύναμη Stokes) γράφεται:

$$F_f = 6\pi r_0 \eta u$$

- Στη φυγοκέντρωση μπορεί να ορισθεί ο *παράγοντας επιτάχυνσης,  $\beta$* , ο οποίος δείχνει πόσες φορές είναι μεγαλύτερη η φυγόκεντρος δύναμη, την οποία υφίσταται το μόριο, από τη δύναμη της γήινης βαρύτητας, ή πόσες φορές είναι μεγαλύτερη η κεντρομόλος επιτάχυνση,  $g$ , της επιτάχυνσης της βαρύτητας,  $g_0 = 9,81 \text{ m/s}^2$ . Έτσι  $\beta = g/g_0$ .
- Ανάλογα με την τιμή του παράγοντα  $\beta$  οι συσκευές φυγοκέντρωσης που χρησιμοποιούνται στην βιοφυσική έρευνα και στην κλινική πράξη διακρίνονται στους παρακάτω τύπους:
  - a) Συνήθεις, επιτραπέζιες, φυγόκεντροι,  $1000 < \beta < 6240$
  - b) Φυγόκεντροι υψηλής ταχύτητας,  $10\ 000 < \beta < 20\ 000$
  - c) Υπερφυγόκεντροι,  $20\ 000 < \beta < 400\ 000$ ,
  - d) Υπερ-υπερφυγόκεντροι,  $\beta > 400\ 000$ .

- Οι φυγόκεντροι υψηλής ταχύτητας και οι **υπερφυγόκεντροι** έχουν ενσωματωμένο **σύστημα ψύξης** για την αποφυγή υπερθέρμανσης των βιολογικών δειγμάτων λόγω τριβών και διατήρηση της θερμοκρασίας σε κανονικά, βιοσυμβατά, επίπεδα. Σε ταχύτητες άνω των 40 000 απαιτείται επίσης λειτουργία σε **πολύ υψηλό κενό**, γιατί οι θερμοκρασίες που αναπτύσσονται είναι υπερβολικά υψηλές.
- Η **οριακή ταχύτητα** που αποκτά το μόριο στη φυγόκεντρο υπολογίζεται από τον β' νόμο του Νεύτωνα (όπου η συνισταμένη των δυνάμεων πρέπει να είναι μηδέν),

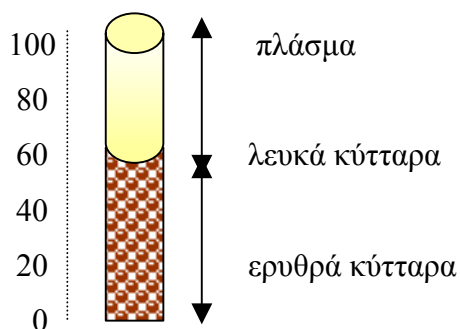
$$\vec{F}_a + \vec{F}_f + \vec{F}_c = 0$$

και επομένως η οριακή ταχύτητα που αποκτά το μόριο καθορίζεται από τη σχέση:

$$u = \frac{\omega^2 r V (\rho - \rho_0)}{f}$$

όπου  $\rho$ ,  $\rho_0$  οι πυκνότητες του μορίου και του διαλύματος αντίστοιχα και  $V$  ο όγκος του σωματιδίου.

- Στη φυγοκέντρωση χρησιμοποιείται ο όρος  **$S = u/\omega^2 r$** , ο οποίος ονομάζεται **συντελεστής καθίζησης** και μετριέται σε μονάδες χρόνου, s. Συνήθως ο συντελεστής καθίζησης εκφράζεται σε μονάδες S (από το όνομα του ερευνητή που μελέτησε το θέμα αυτό, του Svedberg). Η τιμή  $10^{-13}$  s **ορίζεται ως 1 S**.
- Ο συντελεστής S χαρακτηρίζει τις διάφορες πρωτεΐνες, έτσι για παράδειγμα αν τα μόρια της αιμοσφαιρίνης περιστρέφονται με γωνιακή ταχύτητα 30000 στροφές/λεπτό, σε ακτίνα περιστροφής  $r=10$  cm, αποκτούν ταχύτητα  $u=1,6$  mm/h και τότε ο συντελεστής καθίζησης έχει την τιμή 4,4 S ή 0.44 ps. Αν μια άγνωστη πρωτεΐνη στις ίδιες συνθήκες παρουσιάζει τον ίδιο συντελεστή S, χαρακτηρίζεται σαν αιμοσφαιρίνη.
- Ο ρυθμός καθίζησης του ολικού αίματος αυξάνεται σε οξείες μολύνσεις και σε μερικές χρόνιες παθήσεις (π.χ. φυματίωση).



**Κατανομή των συστατικών του αίματος σε σωλήνα φυγοκέντρωσης. Το ύψος της στήλης των ερυθρών κυττάρων σαν ποσοστό του όλου ύψους του σωλήνα φυγοκέντρωσης εκφράζει τον αιματοκρίτη.**

## 👉 Ηλεκτροφόρηση

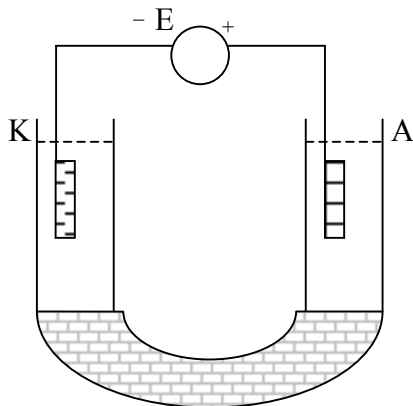
- \* Η **ηλεκτροφόρηση είναι μια μέθοδος διαχωρισμού φορτισμένων ουσιών**, κύρια **πρωτεϊνών**. Κατά την ηλεκτροφόρηση, ηλεκτρικά φορτισμένα μακρομόρια μεταναστεύουν προς τον ένα ή τον άλλο πόλο ενός ηλεκτρικού πεδίου. Η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται ευρύτατα για το διαχωρισμό, απομόνωση και ανάλυση των πρωτεϊνικών μιγμάτων και ιδιαίτερα σε κλινικές αιματολογικές εξετάσεις. Είναι μια κλασσική εργαστηριακή μέθοδος ανάλυσης τόσο στην βιοϊατρική έρευνα, αλλά, κυρίως, στην καθημερινή κλινική πράξη.
- \* Οι πρωτεΐνες σε διάλυμα παρουσιάζονται ιονισμένες χάρη κυρίως στις ομάδες  $\text{COO}^-$  και  $\text{-NH}_3^+$  των αμινοξέων και αυτή η ηλεκτρική συμπεριφορά εξαρτάται βέβαια από τη χημική τους σύσταση, αλλά επίσης και από το pH του διαλύματος.
- \* Οι δυνάμεις που ασκούνται στη φορτισμένη πρωτεΐνη (την οποία υποθέτουμε σφαιρική) είναι:
  - Η **δύναμη Coulomb**,  $F_e$ , λόγω ηλεκτρικού πεδίου έντασης  $E$  σε φορτίο  $q$ ,  $F_e = qE$ .
  - Η **δύναμη τριβής** (νόμος Stokes),  $F_f$ , η οποία ασκείται σε μόριο ακτίνας  $R$ , που βρίσκεται σε υγρό με συντελεστή ιξώδους  $\eta$ ,  $F_f = 6\pi\eta Ru$ .
  - Η **δύναμη του πεδίου βαρύτητας**,  $F_g = mg$ .
- \* Η δύναμη βαρύτητας θεωρείται αμελητέα και επομένως για ομαλή κίνηση του μορίου πρέπει:

$$F_e = F_f \text{ και άρα } qE = 6\pi\eta Ru$$

Από τα παραπάνω συνάγεται η ταχύτητα με την οποία κινούνται τα μόρια, έχοντας καθαρό φορτίο  $q$ , σ' ένα ηλεκτρικό πεδίο έντασης  $E$ :

$$u = \frac{qE}{6\pi R\eta}$$

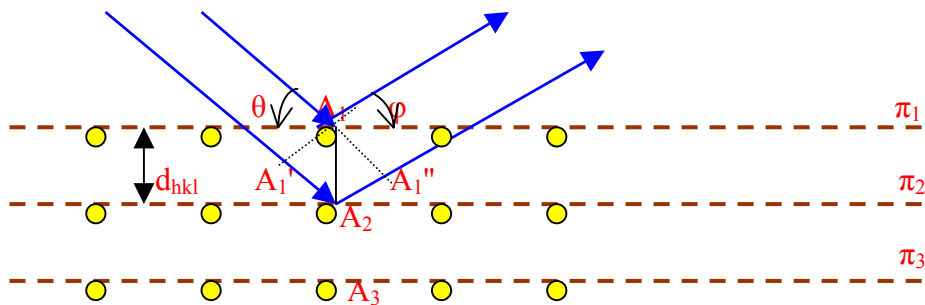
- \* Οι διαφορές στις ταχύτητες μεταφοράς των σωματιδίων κατά την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιούνται για το διαχωρισμό των βιολογικών μακρομορίων (νουκλεϊνικών οξέων, πολυσακχαριτών, πρωτεϊνών, πεπτιδίων).
- \* Η **ηλεκτροφόρηση μπορεί να γίνει είτε σε αέρια ή σε υγρή φάση**, η οποία είναι και η πλέον διαδεδομένη και γίνεται με διάφορους τρόπους: ηλεκτροφόρηση **σε στήλη υγρού**, **σε χαρτί διηθητικό**, **σε συνήθη τάση**, **σε υψηλή τάση** κ.α. Σε ηλεκτρολυτικό φυσιολογικό διάλυμα, δηλαδή ένα ισοτονικό προς κάποιο βιολογικό υγρό διάλυμα (π.χ. το πλάσμα του αίματος), σε θερμοκρασία  $37^\circ \text{C}$  το pH είναι 7,2. **Ισοηλεκτρικό σημείο** μιας πρωτεΐνης καλείται εκείνο το pH για το οποίο η ηλεκτροφορητική κινητικότητα της πρωτεΐνης μηδενίζεται.



Γραφική αναπαράσταση τυπικής συσκευής ηλεκτροφόρησης.

## ➡ *Περίθλαση ακτίνων - X*

- ❖ Η ανακάλυψη της περίθλασης των ακτίνων - X από κρυστάλλους το 1912, από τον Max von Laue αρχικά και τους W.H. Bragg και W.L. Bragg στη συνέχεια, σημείωσε τη γέννηση της *κρυσταλλογραφίας ακτίνων -X*.
- ❖ Σημαντικοί σταθμοί στην πορεία της βιοφυσικής έρευνας με τη βοήθεια αυτής της μεθόδου είναι οι ανακαλύψεις της δεκαετίας 1950-1960 πάνω στη *δομή σφαιρικών πρωτεϊνών* (Perutz και συν., 1953), στη *δομή του DNA* (εργασίες των Wilkins και Franklin, στις οποίες βασίστηκαν οι Watson και Crick για να διατυπώσουν την περίφημη δομή της διπλής έλικας για το μόριο του DNA, το 1953). Η περίθλαση των ακτίνων - X έδωσε επίσης πολύτιμες πληροφορίες για τη *δομή των ιόν*, ενώ σχετικά πρόσφατα η μέθοδος αυτή, σε συνδυασμό με την περίθλαση νετρονίων, έδωσε αποτελέσματα πάνω στη *δομή των μεμβρανών* και υποκυτταρικών σχηματισμών όπως *τα ριβοσώματα και η χρωματίνη*.
- ❖ Η περίθλαση των ακτίνων - X ως βιοφυσική μεθοδολογία προσδιορισμού της δομής βιομορίων και βιολογικών δομών βασίζεται στις *φυσικές αρχές της περίθλασης ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων*. Επειδή πολλά πρωτεϊνικά μόρια έχουν διαστάσεις μερικών δεκάδων Å και οι χημικές ομάδες τους έχουν διαστάσεις μερικών Å, είναι φανερό ότι για να διακρίνουμε λεπτομέρειες της μοριακής δομής πρέπει να χρησιμοποιήσουμε "φως" με μήκος κύματος της τάξης του 1 Å, άρα ηλεκτρομαγνητικά κύματα ή σωματίδια που ισοδυναμούν με ηλεκτρομαγνητικό κύμα αυτού του μήκους κύματος. Οι ακτίνες -X, τα νετρόνια και τα ηλεκτρόνια, με επιμέρους πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα, χρησιμοποιούνται στη μελέτη και αποτύπωση βιοδομών.
- ❖ Για μια πολύ συνοπτική παρουσίαση των βασικών αρχών της περίθλασης ακτίνων -X και της μεθόδου Bragg-Bragg, θα θεωρήσουμε έναν κρύσταλλο σαν μια διαδοχή από παράλληλα, ισαπέχοντα επίπεδα  $\pi_1, \pi_2, \pi_3$  (κάθετα στο επίπεδο του σχήματος), των οποίων τα σημεία του πλέγματος καταλαμβάνονται από άτομα.



*Περίθλαση Bragg ακτίνων -X από τα σημεία διαδοχικών επιπέδων που απέχουν απόσταση  $d_{hkl}$ , όπου οι δείκτες  $h, k, l$  είναι οι κλασσικοί δείκτες Miller. Η γωνία που σχηματίζει η προσπίπτουσα και η ανακλώμενη δέσμη με τα επίπεδα είναι  $\theta$  και  $\varphi$  αντίστοιχα.*

- ❖ Η συνθήκη ενισχυτικής συμβολής των σκεδαζόμενων ακτίνων είναι:  

$$2 d_{hkl} (\sin\theta + \sin\varphi) = n\lambda, \text{ όπου } n=1,2,3, \dots$$
- ❖ Η ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας μεγιστοποιείται όταν  $\theta=\varphi$  και στην περίπτωση αυτή η συνθήκη Bragg παίρνει την κλασσική της μορφή:  

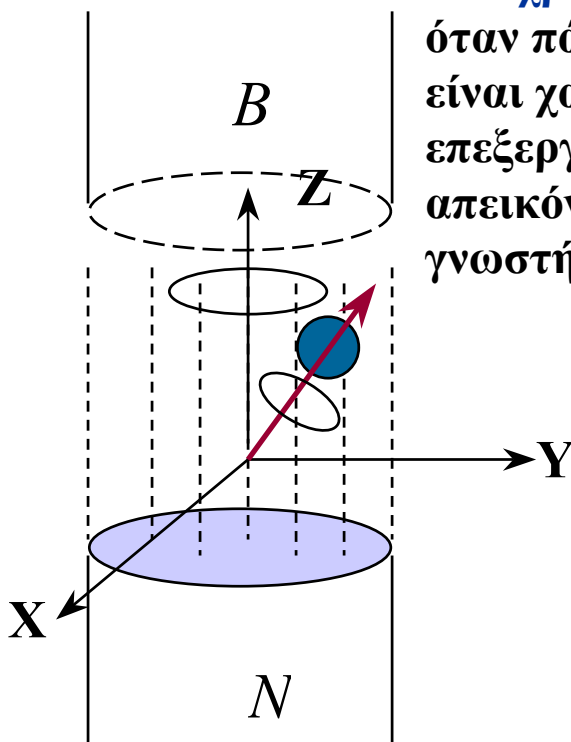
$$2 d_{hkl} \sin\theta_n = n\lambda, \text{ όπου } n=1,2,3, \dots$$
- ❖ Με την εισαγωγή του αντίστροφου πλέγματος, η συνθήκη Bragg γράφεται:  

$$2 \sin\theta_n = n\lambda d^*_{hkl}, \text{ όπου } d^*_{hkl} = 1/d_{hkl}$$

- ❖ Τα περιθλασίμετρα ακτίνων -X είναι συνήθως μεγάλες διατάξεις που περιλαμβάνουν **μηχανικά μέρη** για τον κατάλληλο προσανατολισμό των κρυστάλλων-δειγμάτων ως προς τη δέσμη των ακτίνων -X, **συστήματα καταγραφής** των διαγραμμάτων περίθλασης (φωτογραφικά φιλμ ή απαριθμητές), καθώς και **κατάλληλα υπολογιστικά συστήματα** για υπολογισμούς και καταγραφή των ποσοτικών δεδομένων (π.χ. εντάσεις των ανακλώμενων δεσμών).
- ❖ Ο προσδιορισμός της τρισδιάστατης δομής ενός βιολογικού μακρομορίου είναι ένα πολύ δύσκολο πρόβλημα. Ενδεικτικά αναφέρουμε **τα διάφορα στάδια για τη "λύση" της δομής μια πρωτεΐνης:**
  - **Απομόνωση - καθαρισμός:** Στο στάδιο αυτό επιδιώκεται η απομόνωση του μακρομορίου και η λήψη μιας καθαρής ποσότητας της τάξης των μg, στην οποία βρίσκονται  $10^{15}$ - $10^{18}$  ίδια μακρομόρια.
  - **Κρυστάλλωση:** Στο στάδιο αυτό επιδιώκεται η κρυστάλλωση του μακρομορίου, π.χ. της πρωτεΐνης, για να ληφθούν διαγράμματα περίθλασης πολύ καλής ποιότητας. Αυτό είναι ένα πολύ δύσκολο στάδιο, γιατί κάθε πρωτεΐνη παρουσιάζει ιδιαιτερότητες και απαιτούνται πολλές προσπάθειες μέχρι να επιτευχθεί η βέλτιστη κρυστάλλωση (μικρή διάσταση κρυστάλλου, απουσία "προσμίξεων" ή άλλων ελαττωμάτων στο πλέγμα). Στο στάδιο αυτό παρασκευάζονται και παράγωγα του μακρομορίου με "βαριά" άτομα, ισόμορφα της φυσικής δομής του κρυστάλλου.
  - **Περίθλαση ακτίνων -X (συλλογή - καταγραφή διαγραμμάτων περίθλασης):** Στο στάδιο αυτό καταγράφονται τα διαγράμματα περίθλασης των κρυστάλλων και τουλάχιστον δύο ισόμορφων παραγώγων τους, αρχίζοντας από χαμηλή διακριτική ικανότητα ( $\approx 5\text{\AA}$ ) και φθάνοντας σε καλύτερες τιμές διακριτικής ικανότητας της τάξης του μεγέθους των χημικών δεσμών ( $\approx 2\text{\AA}$ ).
  - **Παραγωγή χαρτών ηλεκτρονικής πυκνότητας:** Στο στάδιο αυτό γίνεται πρώτα ο προσδιορισμός των ηλεκτρονικών πυκνοτήτων με τη βοήθεια της ανάλυσης Fourier και υπολογιστή. Έπειτα γίνεται η αναπαράσταση σε χώρους δύο και τριών διαστάσεων των ηλεκτρονικών πυκνοτήτων που έχουν υπολογισθεί (χάρτης ηλεκτρονικής πυκνότητας) που δίνει μια στερεοσκοπική άποψη του μακρομορίου.
  - **Ερμηνεία των χαρτών - βελτίωση της δομής:** Στο στάδιο αυτό συνδυάζονται οι πληροφορίες που δίνει ο χάρτης ηλεκτρονικής πυκνότητας με αυτές της δευτεροταγούς και πρωτοταγούς δομής του μακρομορίου για να κατασκευαστεί ένα ατομικό ή μοριακό μοντέλο. Στη συνέχεια ακολουθούν διορθώσεις της δομής, με διαδοχικές συσχετίσεις με διάφορους συντελεστές ακριβείας, που καταλήγουν στη βελτίωση της προτεινόμενης δομής. Η αύξηση της υπολογιστικής ικανότητας των σύγχρονων ηλεκτρονικών υπολογιστών έχει συμβάλει θεαματικά στην επιτάχυνση των διαδικασιών ερμηνείας - βελτίωσης της δομής μακρομορίων και στην ανάπτυξη ευκολότερου στη χρήση λογισμικού για την τεχνική της περίθλασης των ακτίνων -X σε βιοδομές.

## ❖ πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός - MRI

- τα **πρωτόνια** έχουν θετικό ηλεκτρικό φορτίο, έχουν **σπιν**, κινούνται και επομένως ισοδυναμούν με μικρούς μαγνήτες.
- τα πρωτόνια προσανατολίζονται κάτω από την επίδραση εξωτερικού μαγνητικού πεδίου και κινούνται μεταπτωτικά γύρω από τις γραμμές του πεδίου με συχνότητα που δίνεται από την **εξίσωση Larmor:  $\omega = \gamma B$** , όπου  $\omega$  η συχνότητα μετάπτωσης,  $B$  η ένταση του εξωτερικού μαγνητικού πεδίου και  $\gamma$  ο γυρομαγνητικός λόγος.
- με την εφαρμογή κατάλληλης **ραδιοσυχνότητας (RF)** σε παλμούς προκύπτει μεταφορά ενέργειας στα πρωτόνια, **συντονισμός**, μαγνήτιση.
- το άτομο του υδρογόνου έχει μόνον ένα πρωτόνιο στον πυρήνα (περιττό αριθμό πρωτονίων) και δίνει ισχυρό σήμα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού.



- Οι **χρόνοι αποκατάστασης** των πυρήνων, όταν πάψει να εφαρμόζεται ο παλμός RF, είναι χαρακτηριστικοί και με κατάλληλη επεξεργασία σε **υπολογιστή** οδηγούν στην απεικόνιση μαγνητικού συντονισμού, τη γνωστή ως **μαγνητική τομογραφία**.